

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

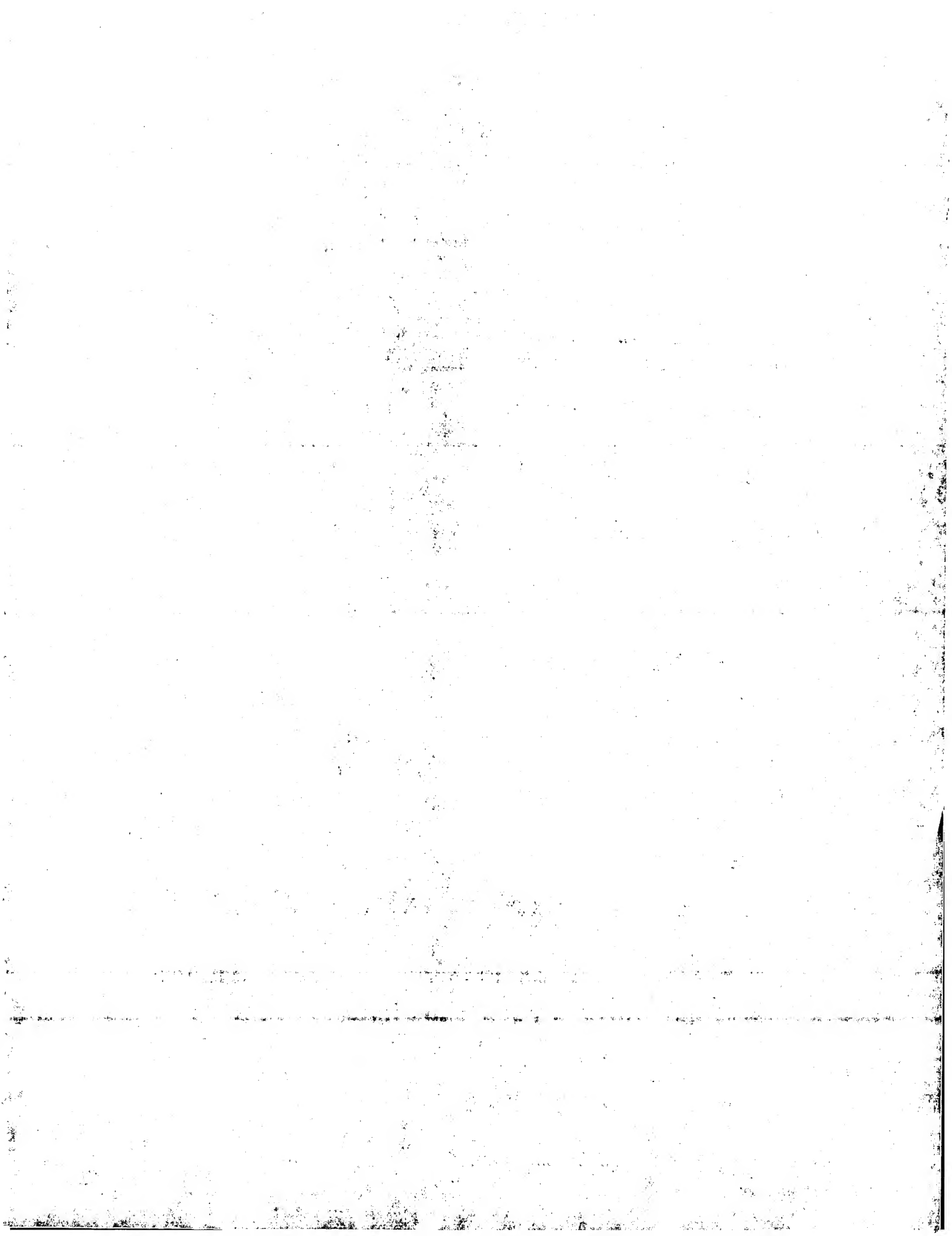
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



申请号: 99802768.5 公开号: CN1291198A

Fc 受体的三维结构和模型及其应用

3-dimensional structure and model of Fc receptor and its application

Abstract:

The present invention relates to crystal of Protein FcγRIIa, its structural 3-dimensional coordinate and structure and model coming from FcγRIIa structure. The invention also relates to crystal of Protein FcεRIIa, its 3-dimensional coordinate of single unit, and dimer come from FcγRIIa structure. The invention also relates to 3-dimensional coordinate of protein FcγRIIIb, and its model deduce from FcγRIIa structure. Additional, this invention also include method for preparing crystals, crystal structures and models mentioned above, application of them. Drug design based on structure and mixture with therapeutic efficiency also include in this invention.

附件 2



[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/735

A61K 38/17 G06T 15/00

G06T 17/40

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99802768.5

[43] 公开日 2001 年 4 月 11 日

[11] 公开号 CN 1291198A

[22] 申请日 1999.2.4 [21] 申请号 99802768.5

[30] 优先权

[32] 1998.2.6 [33] US [31] 60/073,972

[32] 1998.9.11 [33] US [31] 60/099,994

[86] 国际申请 PCT/IB99/00367 1999.2.4

[87] 国际公布 WO99/40117 英 1999.8.12

[85] 进入国家阶段日期 2000.8.7

[71] 申请人 伊来克萨斯独资有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

[72] 发明人 P·马克·霍格思 马雷·S·鲍威尔

伊恩·F·C·麦肯齐

凯利·F·麦克斯韦尔

托马斯·P·J·加勒特

维丹娜·艾帕尔 乔纳森·B·贝尔

巴里·R·马修斯 托马斯·D·麦卡锡

杰弗里·A·彼得斯

[74] 专利代理机构 隆天国际专利商标代理有限公司

代理人 杨淑媛 郑霞

权利要求书 12 页 说明书 264 页 附图页数 18 页

[54] 发明名称 Fc 受体的三维结构和模型及其应用

[57] 摘要

本发明公开了晶体、晶体结构的 FcγR II a 蛋白、FcγR II a 蛋白的三维坐标、以及由 FcγR II a 结构得到的结构和模型。本发明还公开了 FcεR I 蛋白的晶体和 FcεR I 蛋白单体的三维坐标以及由 FcγR II a 结构得到的二聚体。本发明还公开了 FcγR III b 蛋白的三维坐标和由 FcγR II a 结构得到的 FcγR III b 的模型。本发明还包括制备所述晶体、晶体结构以及模型的方法。另外,还公开了所述晶体、晶体结构以及模型的用途,包括基于结构的药物设计和治疗组合物。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种Fc 受体(FcR)蛋白模型, 其中所述模型具有与表1原子坐标基本符合的三维结构。

5 2. 权利要求1的模型, 其中所述结构基本符合表1中列出的原子坐标和B-数值。

3. 权利要求1的模型, 其中所述结构为单体。

4. 权利要求1的模型, 其中所述结构为二聚体。

10 5. 权利要求1的模型, 其中所述结构基本符合选自下列表列出的原子坐标: 表2、表3、表4和表5。

6. 权利要求1的模型, 其中所述结构的至少约50%对于在其每个结构域次级结构中的骨架原子具有平均均方根偏差(RMSD)小于约1.5Å。

7. 权利要求1的模型, 其中所述结构与含所述原子坐标的结构之间的共有氨基酸侧链的约50%具有小于约1.5Å的平均均方根偏差(RMSD)。

15 8. 权利要求1的模型, 其中所述的FcR蛋白含有一段氨基酸序列, 该序列与选自的下列序列的氨基酸序列具有至少约25%的同源性: SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12。

20 9. 权利要求1的模型, 其中所述的FcR蛋白含有一段氨基酸序列, 该序列与选自的下列序列的氨基酸序列具有至少约40%的同源性: SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12。

10. 权利要求1的模型, 其中所述的FcR蛋白含有一段氨基酸序列, 该序列与选自的下列序列的氨基酸序列具有至少约60%的同源性: SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和SEQ ID NO:12。

25 11. 权利要求1的模型, 其中所述的FcR蛋白含有一段氨基酸序列: 其选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、

SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、任一所述氨基酸序列的突变体以及任一所述氨基酸序列的等位变体。

12. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白含有一段氨基酸序列：其选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13；SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13的突变体；以及SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13的等位变体。

13. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcγRI 蛋白、FcγRIIa 蛋白、FcγRIIb 蛋白、FcγRIIc 蛋白、FcγRIII 蛋白、FcεRI 蛋白、FcαRI 蛋白以及任一所述FcR蛋白的结构同系物。

14. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcγRI 蛋白、FcγRIIa 蛋白、FcγRIIb 蛋白、FcγRIIc 蛋白、FcγRIII 蛋白、FcεRI 蛋白和FcαRI蛋白。

15. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcγRIIa 蛋白单体、FcγRIIa 蛋白二聚体以及所述FcγRIIa 蛋白的结构同系物。

16. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcεRI 蛋白二聚体、FcεRI 蛋白单体以及所述FcεRI 蛋白的结构同系物。

17. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcγRI 蛋白二聚体、FcγRI 蛋白单体以及所述FcγRI 蛋白的结构同系物。

18. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcγRIIb 蛋白二聚体、FcγRIIb蛋白单体以及所述FcγRIIb蛋白的结构同系物。

19. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcγRIIc蛋白二聚体、

FcγRIIc蛋白单体以及所述FcγRIIc蛋白的结构同系物。

20. 权利要求1中的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcγRIIIb 蛋白二聚体、FcγRIIIb蛋白单体以及所述FcγRIIIb蛋白的结构同系物。

21. 权利要求1的模型，其中所述的FcR蛋白选自FcαRI蛋白二聚体、FcαRI蛋白单体以及所述FcαRI蛋白的结构同系物。

22. 权利要求1的模型，其中所述的原子坐标由下列方法制备，该方法包括：

(a) 以结晶形式提供FcγRIIa 蛋白；

(b) 制备所述结晶FcγRIIa蛋白的电子密度图；以及

(c) 分析所述电子密度图以制备所述的原子坐标。

23. 权利要求22的模型，其中所述的结晶FcγRIIa蛋白由包括下列方法制备：

合并FcγRIIa 蛋白与选自下列的母液缓冲液：醋酸盐缓冲液和硫酸盐缓冲液，以及诱导晶体形成以制备所述结晶FcγRIIa 蛋白。

24. 权利要求23的模型，其中所述的醋酸盐缓冲液包括约200 mM 醋酸铵、约100 mM柠檬酸钠和约30% PEG 4000，所述缓冲液的pH值约为5.6。

25. 权利要求23的模型，其中所述的硫酸盐缓冲液包括约0.1 M HEPES和约1.5 M 硫酸锂，所述缓冲液的pH值约为7.5。

26. 权利要求22的模型，其中所述的制备电子密度图的步骤包括用X-射线衍射分析所述的结晶FcγRIIa蛋白。

27. 权利要求22的模型，其中在进行所述X-射线衍射前用二-γ-碘 双[乙二胺] 硝酸二铂 (II)对所述的结晶FcγRIIa蛋白进行衍生化处理。

28. 权利要求22的模型，其中在进行所述X-射线衍射前用5 mM 二-γ-碘 双[乙二胺] 硝酸二铂 (II)对所述的结晶FcγRIIa蛋白进行衍生化处理。

29. 权利要求1的模型，其中所述模型是用由一套所述三维结构的三维

坐标编码的计算机-可读介质制备而成的计算机图象，其中，使用一种图形展示软件程序，所述三维结构坐标建立了一种电子文档，该电子文档可以在能把所述电子文档表示为三维结构图象的计算机上展现出来。

30. 一种基于结构的生物活性化合物的药物设计的计算机辅助方法，该方法包括：

a. 提供一种Fc受体(FCR)蛋白模型，其中所述模型表现为一种基本符合表1的原子坐标的三维结构；

b. 用所述模型设计一种化学化合物；以及，

c. 化学合成所述的化学化合物。

31. 权利要求30的方法，其中所述方法进一步包括：

d. 评估所述的合成化学化合物的生物活性。

32. 权利要求30的方法，其中所述的三维结构包括表1中列出的原子坐标。

33. 权利要求30的方法，其中所述的三维结构是二聚体。

34. 权利要求30的方法，其中所述的三维结构包括选自下列的表中列出的原子坐标：表 2、表 3、表 4和表 5。

35. 权利要求30的方法，其中所述的模型包括当在计算机上分析表1中列出的原子坐标时制备而成的计算机图象，使用一种图形展示软件程序以建立所述图象的电子文档，并将所述电子文档在能把所述电子文档表示为三维结构图象的计算机上展示出来。

36. 权利要求30的方法，其中所述的设计步骤包括计算机筛选一个或多个化学化合物数据库，其中所述化合物的三维结构是已知的。

37. 权利要求36的方法，该方法进一步包括让所述筛选步骤鉴定出的化合物与所述计算机模型相互作用。

38. 权利要求30的方法，其中所述的设计步骤包括定向药物设计。

39. 权利要求30的方法，其中所述的设计步骤包括随机药物设计。

40. 权利要求30的方法，其中所述的设计步骤包括基于网格的药物设计。

41. 权利要求30的方法，其中所述的设计步骤包括筛选出那些被预测为模拟所述FcR 蛋白的三维结构的化合物。

42. 权利要求30的方法，其中所述的设计步骤包括筛选出那些被预测为能够结合所述FcR 蛋白三维结构的化合物。

43. 权利要求30的方法，其中所述的生物活性选自：抑制所述FcR 蛋白与免疫球蛋白的结合，与所述FcR蛋白的结合，能够与所述FcR蛋白结合的免疫球蛋白的结合，抑制所述免疫球蛋白的吞噬作用，抑制所述FCR蛋白二聚体的形成，通过所述的FcR蛋白刺激细胞信号传导，通过FcR蛋白刺激细胞因子的释放。

44. 权利要求30的方法，其中所述的FCR蛋白是FcγRIIa，且所述生物活性选自：抑制FcγRIIa 蛋白与IgG的结合，抑制IgG的吞噬作用，抑制FcγRIIa 蛋白二聚体形成，通过FcγRIIa蛋白刺激细胞信号传导，刺激选自IL-6和IL-12的细胞因子的释放。

45. 权利要求30的方法，其中所述的FCR蛋白是FcγRIIIb，且所述生物活性选自：抑制FcγRIIIb蛋白与IgG的结合，抑制IgG的吞噬作用，抑制FcγRIIIb 蛋白二聚体形成，通过FcγRIIIb蛋白刺激细胞信号传导，刺激选自IL-6和IL-12的细胞因子的释放。

46. 权利要求30的方法，其中所述的FCR蛋白是FcεRI，且所述生物活性选自：抑制FcεRI蛋白与IgE的结合，抑制IgE的吞噬作用，抑制FcεRI蛋白二聚体形成，通过FcεRI蛋白刺激细胞信号传导，通过肥大细胞刺激组胺和5-羟色胺的释放以及通过肥大细胞抑制组胺和5-羟色胺的释放。

47. 一种基于结构的生物活性化合物的药物设计的计算机辅助方法，该

方法包括：

a. 提供一种Fc受体(FcR)蛋白模型，其中所述模型表现为一种基本符合选自下列原子坐标的三维结构：表1中列出的原子坐标；表2中列出的原子坐标；表3中列出的原子坐标；表4中列出的原子坐标；以及表5中列出的原子

5 坐标；

b. 用所述模型设计一种化学化合物；以及，

c. 化学合成所述的化学化合物。

48. 一种基于结构的生物活性化合物的药物设计的计算机辅助方法，该

方法包括：

10 a. 提供一种Fc受体(FcR)蛋白的三维结构模型，其中所述Fc受体(FcR)蛋白选自FcγRIIa、FcγRIIIb 和FcεRI；

b. 用所述模型设计一种化学化合物；以及，

c. 化学合成所述的化学化合物。

49. 一种FcR蛋白的三维结构的三维计算机图象。

15 50. 权利要求49的图象，其中所述结构基本符合选自下列的三维坐标：

表1中列出的三维坐标；表2中列出的三维坐标；表3中列出的三维坐标；表4中列出的三维坐标；以及表5中列出的三维坐标。

51. 权利要求49的图象，其中所述计算机图象是当在计算机上分析包括所述三维坐标的一套三维坐标时而建立的，使用一种图形展示软件程序以建立所述图象的电子文档，并将该电子文档在能把所述电子文档表示为三维图

20 象的计算机上展现出来。

52. 权利要求49的图象，其中所述的三维计算机图象用选自下列的二维图象表现：图 4、图 6、图 7、图 8、图 9、图 10、图 14、图 15 和图16。

53. 权利要求49的图象，其中所述的三维计算机图象用于设计治疗化合

25 物。

54. 一种用具有三维结构的一套FcR蛋白的三维坐标编码的计算机可读介质，所述蛋白的三维结构基本符合表1中的原子坐标，其中，使用一种图形展示软件程序，所述三维坐标建立了一种可在能够把所述电子文档表示为三维图象的计算机上展现出来的电子文档。

5 55. 一种用一套选自下列的三维坐标编码的计算机可读介质：表1中列出的原子坐标；表2中列出的原子坐标；表3中列出的原子坐标；表4中列出的原子坐标；以及表5中列出的原子坐标，其中，使用一种图形展示软件程序，所述三维坐标建立了一种可在能够把所述电子文档表示为三维图象的计算机上展现出来的电子文档。

10 56. 一种FcR蛋白的三维结构模型，所述FcR蛋白选自FcγRI 蛋白、FcγRIIb蛋白、FcγRIIc蛋白、FcγRIIIb 蛋白、FcεRI 蛋白以及FcαRI 蛋白，所述模型由下述方法制备而成，该方法包括：

(a) 提供FcγRIIa蛋白的氨基酸序列和所述FcR 蛋白的氨基酸序列；

(b) 鉴定所述FcγRIIa氨基酸序列与所述FcR 蛋白氨基酸序列之间共有的
15 结构保守区域；以及

(c) 测定所述FcR蛋白的原子坐标，通过把所述FcR蛋白的所述结构保守区域分配给三维结构，使用所述FcγRIIa 蛋白的三维结构，该结构基本符合表1中列出的原子坐标，衍生出所述FcR蛋白氨基酸序列的所述三维结构的模型。

20 57. 权利要求56的模型，其中所述FcγRI 蛋白氨基酸序列包括SEQ ID NO:7；其中所述FcγRIIb蛋白氨基酸序列包括SEQ ID NO:5；其中所述FcγRIIc 蛋白氨基酸序列包括SEQ ID NO:6；其中所述FcγRIIIb蛋白氨基酸序列包括SEQ ID NO:8；其中所述FcεRI蛋白氨基酸序列包括SEQ ID NO:9；以及其中所述FcαRI 蛋白氨基酸序列包括SEQ ID NO:13。

25 58. 一种治疗组合物，当施用给动物时，该组合物能减轻IgG-介导的组

织损伤，所述治疗组合物包括一种抑制Fcγ受体(FcγR)蛋白的抑制化合物，所述抑制化合物可以用下述方法来鉴别，该方法包括：

(a) 提供一种FcγR蛋白的三维结构，该蛋白选自FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc和FcγRIIIb，其中所述的FcγR蛋白三维结构基本符合表1中列出的原子坐标；

(b) 使用所述FcγR蛋白的所述三维结构设计一种选自下列的化学化合物：能抑制FcγR蛋白与IgG结合的化合物、基本上模拟FcγR蛋白的三维结构的化合物、以及抑制FcγR蛋白与一种通过FcγR蛋白刺激细胞信号传导的分子结合的化合物；

10 (c) 化学合成所述化学化合物；以及

(d) 评估所述合成化学化合物减轻IgG-介导组织损伤的能力。

59. 权利要求58的组合物，其中所述IgG-介导组织损伤起因于选自下列的生物应答：IgG-介导的过敏性、IgG-介导的炎症细胞募集以及 IgG-介导的炎症调制剂的释放。

15 60. 权利要求58的组合物，其中所述结构基本符合表1中列出的原子坐标。

61. 权利要求58的组合物，其中所述的化学化合物选自无机化合物和有机化合物。

20 62. 权利要求58的组合物，其中所述的化学化合物选自寡核苷酸、肽、肽模拟化合物以及有机小分子。

63. 权利要求58的组合物，其中所述的化学化合物选自所述FcγR蛋白的类似物、FcγR蛋白的底物类似物以及FcγR蛋白的肽模拟化合物。

64. 权利要求58的组合物，其中所述的组合物进一步包括一种选自下列的成分：赋形剂、佐剂和载体。

25 65. 一种治疗组合物，当施用给动物时，该组合物能增强IgG-介导的应

答, 所述治疗组合物包括一种刺激Fcγ 受体(FcγR)蛋白活性的刺激化合物, 所述刺激化合物可以用下述方法来鉴别:

(a) 提供一种FcγR蛋白的三维结构, 该蛋白选自FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc和FcγRIIIb, 其中所述FcγR蛋白的所述三维结构基本符合表1中列出的
5 原子坐标;

(b) 使用所述FcγR 蛋白的所述三维结构设计一种选自下列的化学化合物: 刺激FcγR蛋白与IgG结合的化合物、基本上模拟FcγR蛋白的三维结构的化合物以及刺激FcγR蛋白与一种可通过FcγR蛋白刺激细胞信号传导的分子结合的化合物;

10 (c) 化学合成所述化学化合物; 以及

(d) 评估所述合成化学化合物增强IgG-介导应答的能力。

66. 一种治疗组合物, 当施用给动物时, 该组合物能减弱IgE-介导的应答, 所述治疗组合物包括一种抑制Fcε受体I (FcεRI)蛋白活性的抑制化合物, 所述抑制化合物可以用下述方法来鉴别, 该方法包括:

15 (a) 提供一种FcεRI蛋白的三维结构; 其中所述FcεRI蛋白的三维结构基本符合选自下列的原子坐标: 表1中列出的原子坐标; 表2中列出的原子坐标; 表3中列出的原子坐标; 表4中列出的原子坐标以及表5中列出的原子坐标;

(b) 使用所述FcεRI 蛋白的所述三维结构设计一种选自下列的化学化合物: 抑制FcεRI 蛋白与IgE结合的化合物、基本上模拟FcεRI蛋白的三维结构的化合物以及抑制FcεRI 蛋白与一种可通过FcεRI蛋白刺激细胞信号传导的
20 分子结合的化合物;

(c) 化学合成所述化学化合物; 以及

(d) 评估所述合成化学化合物减弱IgE-介导应答的能力。

67. 权利要求66的组合物, 其中所述IgE-介导的应答起因于选自下列的
25 生物应答: IgE-介导的过敏性、IgE-介导的炎症细胞募集以及 IgE-介导的炎

症调制剂的释放。

68. 权利要求66的组合物，其中所述的结构包括表3中列出的原子坐标。

69. 权利要求66的组合物，其中所述的结构包括表4中列出的原子坐标。

70. 权利要求66的组合物，其中所述的化学化合物选自无机化合物和有
5 机化合物。

71. 权利要求66的组合物，其中所述的化学化合物选自寡核苷酸、肽、
肽模拟化合物以及有机小分子。

72. 权利要求66的组合物，其中所述的化学化合物选自所述FcεR蛋白的
类似物、FcεR蛋白的底物类似物以及FcεR蛋白的肽模拟化合物。

10 73. 权利要求66的组合物，其中所述的组合物进一步包括一种选自下列
的成分：赋形剂、佐剂和载体。

74. 一种治疗组合物，当施用给动物时，该组合物能增强IgE-介导的应
答，所述治疗组合物包括一种刺激Fcε受体I (FcεRI)蛋白活性的刺激化合物，
所述刺激化合物可以用下述方法来鉴别，该方法包括：

15 (a) 提供一种FcεRI蛋白的三维结构，其中所述FcεRI蛋白的所述三维结
构基本符合选自下列的原子坐标：表1中列出的原子坐标；表2中列出的原子
坐标；表3中列出的原子坐标；表4中列出的原子坐标；以及表5中列出的原
子坐标；

20 (b) 使用所述FcεRI 蛋白的所述三维结构设计一种选自下列的化学化合
物：刺激FcεRI 蛋白与IgE结合的化合物、基本上模拟FcεRI蛋白三维结构的
化合物以及刺激FcεRI 蛋白与一种可通过FcεRI蛋白刺激细胞信号传导的分
子结合的化合物；

(c) 化学合成所述化学化合物；以及

(d) 评估所述合成化学化合物增强IgE-介导应答的能力。

25 75. 一种测定FcR蛋白三维结构的方法，该方法包括：

(a) 提供FcR 蛋白的氨基酸序列，所述FcR 蛋白选自FcγRI 蛋白、FcγRIIb 蛋白、FcγRIIc 蛋白、FcγRIII b蛋白、 FcεRI 蛋白和FcαRI蛋白，其中所述FcR蛋白的所述三维结构是未知的；

(b) 通过折叠识别，分析所述氨基酸序列在三维构象中的折叠方式；以

5 及

(c) 将所述FcR蛋白氨基酸序列的折叠方式与所述FcγRIIa蛋白的三维结构比较，以确定所述FcR蛋白的三维结构，其中所述FcγRIIa蛋白的所述三维结构基本符合表 1中列出的原子坐标。

76. 一种获得FcR 蛋白三维结构模型的方法，该方法包括下述步骤：

10 (a) 提供FcγRIIa蛋白的氨基酸序列和一种FcR 蛋白的氨基酸序列；
(b) 鉴定所述FcγRIIa氨基酸序列与所述FcR 蛋白氨基酸序列之间共有的结构保守区域；

(c) 测定所述目标结构的原子坐标，通过把所述FcR蛋白的所述结构保守区域分配给三维结构，使用以一种原子坐标为基础的FcγRIIa 蛋白的三维结构获得所述FcR蛋白氨基酸序列的三维结构模型，上述原子坐标基本符合表1中列出的原子坐标。

77. 权利要求76的方法，该方法进一步包括通过使用旋转异构体库测定空间允许位置从而分配所述FcR蛋白侧链的原子坐标。

78. 一种获得结晶FcR蛋白三维结构的方法，该方法包括下述步骤：

20 (a) 将结晶FcR蛋白的帕特森函数与结晶FcγRIIa蛋白的帕特森函数比较，制备所述结晶FcR蛋白的电子密度图；以及

(b) 分析所述电子密度图制备所述结晶FcR 蛋白的所述三维结构。

79. 权利要求78的方法，该方法进一步包括下述步骤：电子模拟结晶FcR蛋白的所述三维结构以获得所述结晶FcR蛋白的所述三维结构的计算机图

25 象。

80. 权利要求78的方法，该方法进一步包括下述步骤：根据所述结晶FcγRIIa蛋白的所述帕特森函数旋转所述结晶FcR蛋白的所述帕特森函数，测定所述结晶FcR蛋白在其晶体内的正确朝向，从而鉴定出所述结晶FcR蛋白的初始相。

81. 一种组合物，其包括以晶体形式存在的FcγRIIa 蛋白。

说明书

Fc 受体的三维结构和模型及其应用

5 发明领域

本发明涉及 Fc 受体(FcR)的三维结构,包括晶体 FcγRIIa、晶体 FcεRI、FcγRIIa 蛋白的三维坐标, FcγRIIa 的三维结构,以及从 FcγRIIa 结构衍生而来的 FcR 的三维结构,尤其是 FcεRI 和 FcγRIIb,及其模型,以及这些结构及模型的应用。

10 发明背景

Fc 受体(FcR)是一类高度相关的受体家族,其对免疫球蛋白(Ig)的 Fc 区具有特异性,这些受体在正常的免疫作用和抵抗感染中起着重要的作用,且给体液免疫系统提供了一个细胞表面效应器,受体根据免疫球蛋白的类型来分类,根据其所结合的免疫球蛋白来命名,如受体 FcγR 结合免疫球蛋白(IgG),受体 FcεR 结合ε免疫球蛋白(IgE),FcαR 结合α免疫球蛋白(IgA),在 FcγR 受体中已鉴定出三个亚族:包括 FcγRI,它对 IgG 具有很高的亲合性;FcγRII,它对 IgG 具有较低的亲合性,其极易结合免疫复合体的聚集体;FcγRIII,它是与免疫复合体结合的亲合性低的受体。这些受体在结构上高度相关,但有不同的功能。FcγRII 的结构和功能是很有趣的,因为它与免疫复合体相互作用,并与疾病的相关。

20 FcγR在大部分造血细胞上表达,且其通过与IgG结合,在免疫系统的自稳定与宿主抵抗感染者的入侵中扮演重要角色。FcγRII是一种对IgG具低亲合性的受体,其基本上只与IgG免疫复合体相结合,并在包括下列细胞的多种细胞上表达,包括单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜曙红细胞、血小板和B淋巴细胞。FcγRII参与许多免疫与炎症反应,包括抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用、免疫复合体的清除、炎症介导因子的释放、抗体产生的调

节。IgG与一个FcγR分子的结合可以导致有FcγR参与作用的疾病征象的显示。例如，自身免疫疾病紫癜性血小板减少会引起组织血小板损伤，这是由于FcγR依赖的血小板的IgG免疫复合体激活作用或由于FcγR⁺的噬细胞引起血小板破坏。而且，已知有各种炎症疾病中有IgG免疫复合体的作用（如风湿性关节炎、系统性红斑狼疮），其包括II型和III型过敏性反应。II型和III型过敏性反应由IgG介导，它可激活补体介导的或噬细胞效应器机制，导致组织损伤。

FcγRIIa、FcεRI或任何其它FcR受体蛋白结构的阐明，在为疾病控制的治疗或诊断试剂的设计中具有重要作用。在本发明之前，FcγRIIa的结构及由FcγRIIa调控免疫应答的机制尚不清楚。因此，除了关于FcγRIIa的一般的多功能角色外，因缺乏受体的结构信息而使疾病治疗或诊断试剂的开发受限制。FcγRIIa的线性核酸与氨基酸序列都已经有了报道（Hibbs 等，Proc. Natl. Acad. Sci. 美国，第85卷，第2240-2244页，1988），通过对下列蛋白的突变研究，包括人FcγRIIa [Hulett等，欧洲免疫学杂志(Eur. J Immunol.),第23卷，第40-645页，1993; Hulett等，生物化学杂志(J. Biol. Chem.),第69卷，第15287-15293页1994; 和 Hulett等，生物化学杂志(J. Biol. Chem.),第270卷，第21188-21194页，1995)，人的FcγRIIb [Hibbs等，免疫学杂志(J. Immunol.),第152卷，第4466页，1994; 和Tamm等，生物化学杂志(J. Biol. Chem.),第271卷，第3659页，1996)和鼠的FcγRI [(Hulett等，免疫学杂志(J. Immunol.),第148，第1863-1868页，1991)]，已经确定了结合IgG的FcγR的许多重要的区域，但是基于线性序列的信息不能精确预测蛋白的三维结构及其功能结构域，Huber等[分子生物学杂志(J. Mol. Biol.),第230卷，第1077-1083页，1993]已经描述了新生鼠Fc受体蛋白(FcRn)的晶体形成，Burmeister等[自然(Nature),第372卷，第336-343页，1994; 和自然(Nature),第372卷，第379-383页，1994]已经描述了FcRn晶体结构。但是在结构与功能上，FcRn与主要组织相容性蛋白

复合体紧密相关，而与白细胞FcγR家族在结构或功能上不相关，因此，FcRn的蛋白结构不能用来预测本发明的FcR结构。

5 FcεR在肥大细胞上表达，通过与IgE结合，引发一种炎症免疫反应，该炎症免疫反应最初是由于肥大细胞的去粒化作用而导致的炎症介导因子如组胺和血清素的释放而引起的。这些介导因子的释放引起局部血管渗透性和增加局部组织的液流，包括多形核细胞进入这些区域。因此，IgE结合FcεRI能导致疾病征象的显示，它包括导致从消化道的液体流失，增加粘液分泌和支气管萎缩，这些症状典型地与有关过敏性炎症反应的疾病有关。因此FcεRI蛋白结构的阐明对治疗或诊断试剂的设计具有重要作用，特别地，对于与过
10 敏性炎症反应和其他基于Th-2的免疫应答有关的疾病的治疗，有着重要作用。就上面提到的FcγR来说，人的FcεRI的线性核酸和氨基酸序列已经有报道了[Kochan等, 1998, Nuc. Acid. Res. 16:3584]。但是在本发明之前，FcεR的结构及其调控免疫应答的机制还是未知的。因此，尽管有关于FcεRI的一般功能与作用的知识，但是为治疗或诊断疾病（例如那些与过敏炎症有关的
15 疾病）而进行试剂开发则因为缺乏受体的结构信息而受到限制。

因此，有必要阐明Fc受体的三维结构和建立其模型，以便利用这些结构和模型来辅助疾病治疗策略，譬如药物设计。

发明概述

本发明涉及晶体FcγRIIa和晶体FcεRI、FcγRIIa蛋白的三维坐标、FcγRIIa
20 的三维结构、以及从FcγRIIa的结构衍生而来的Fc受体(FcR)的结构和模型，包括FcεRI和FcγRIIb，以及这些结构和模型的应用。获得这些晶体是一个意外的收获。大家都知道，在蛋白质晶体学领域中，要获得有足够质量的晶体用来确定蛋白质的结构不是很容易的。而且，在本发明之前，关于为解析FcγRIIa的三维结构（3-D）而需要的要足够质量的晶体一直没有得到。因
25 此，在本发明之前，FcγRIIa的三维结构也无法确定。此外，在本发明之前，

也不可能得到其他的Fc受体(FcR)的衍生三维结构和模型。本发明者是第一个阐明这些三维结构，并为针对FcεRI和FcγRIIIb的药物设计提供三维模型。

相应地，本发明的一个目的是，为确定FcγRIIa的高分辨率三维结构提供足够质量的晶体，优选的是分辨率达1.8Å。本发明也包括培养晶体FcγRIIa的方法。

本发明的另一个目的是提供 FcεRI 蛋白的晶体，特别是得到质量足够好的晶体以用来获得 FcεRI 的高分辨率的三维结构。本发明还包括培养 FcεRI 晶体的方法。

晶体FcγRIIa和FcεRI的价值不仅仅是能够得到这种晶体。譬如，得到的关于FcγRIIa晶体结构的知识已经被本发明者用来确定此前还未知三维结构的FcγRIIa蛋白，用来模拟及衍生此前还未知三维结构的FcεRI蛋白的原子坐标，及此前未知结构的FcγRIIIb蛋白的三维结构，而且能被用来模拟那些基本上具有相关的线性氨基酸序列的未知三维结构的其他FcR蛋白的结构，例如FcγR蛋白家族的其他成员和FcαRI蛋白。FcγR家族蛋白有三个成员，包括FcγRI、FcγRII 和FcγRIII，他们都是免疫调节分子，且都与IgG结合。比较FcγR家族受体的核酸和氨基酸序列发现这些受体是高度同源的。而且，FcγR家族受体的每个成员分子都属于Ig超家族分子，一种基于已确立好的标准的分类(Hulett 等, 1994, *ibid.*)。而且，FcγRII、FcγRIII、FcεRI 和 FcαRI每者都含有Ig-样结构域，其表示这些受体间的相似性。FcγRI含有三个Ig-样结构域。但是，FcγRI的第一和第二结构域基本上与FcγRII、FcγRIII、FcεRI和FcαRI的Ig-样结构域是同源的。现在通用的不依赖于x-射线衍射技术的从而不必做蛋白结晶的三维结构确定方法(即，计算机模拟与核磁共振技术)可以根据FcγRIIa蛋白的三维结构来衍生和精化其他FcγR蛋白结构模型，如FcεRI和FcαRI蛋白。因此，关于FcγRIIa的三维结构的知识为研究所有这类蛋白的结构提供了一个起点。

相应地，~~本发明的第三个目的即是提供了关于 FcγRIIa 蛋白结构与模~~
~~型、原子坐标及其他衍生的 FcγR 家族蛋白如 FcγRI 和 FcγRIII 蛋白的三~~
~~维结构的信息。~~

关于 FcγRIIa 的三维结构和其他 FcR 的模型的知识为设计和生产在动物体
5 内（包括人）调节免疫功能和炎症反应的化合物提供了一种方式（即基于结
构的药物设计）。譬如，通过使用各种计算机程序和模型，可以设计化合物
来阻止免疫球蛋白与 Fc 受体的结合。

~~本发明的另一个实施方案是提供 FcR 的三维结构的三维计算机图象。~~

10 本发明的另一个实施方案是提供 ~~一种由选自下述的三维坐标编码的~~
~~计算机可读介质：~~表 1、表 2、表 3、表 4 及表 5 中所列出的三维坐标编
码，其中使用图形展示软件，可以利用这些三维坐标数据电子文件，其
使得在计算机上能显示出所述电子文件表示的一个三维图象。

相应的，本发明的第三个目的是提供 ~~一种方法~~，其利用 FcR 如 FcγRIIa
的三维结构，及由该结构衍生出来的结构、坐标、模型等来设计用于治
15 疗和诊断疾病的试剂，譬如，通过结合或模拟 FcR 蛋白的作用、结合或
模拟免疫球蛋白(Ig)的作用，通过阻止两个 FcR 蛋白的二聚体化作用破
坏通过 FcR 蛋白实现的细胞信号传导途径，或通过提高两个 FcR 蛋白的
二聚体化作用来加强细胞信号传导途径。

关于 FcR 三维结构的知识也提供了一种方法，其通过分析蛋白结构
20 及蛋白各氨基酸之间的相互作用，以设计蛋白质，改变蛋白质的有益功
能。譬如，设计出具有提高了对免疫球蛋白或免疫复合体的结合能力的
治疗用蛋白质，其可用作治疗的化合物，以阻止免疫复合体与细胞结合，
或提高生物应答能力，如基于 FcR 与免疫球蛋白或免疫复合体的结合的
细胞信号传导。因此基于三维结构信息，可以得到工程重组的性能改善
25 的可溶性的 FcR。

相应地，本发明的第四个目的是提供利用 FcR 的三维结构来产生具有改变了的生物活性的重组蛋白。

本发明的一个具体实施方案是FcR蛋白的一个模型，该模型代表FcR蛋白的三维结构，该结构基本上符合表1中所列的原子坐标。本发明的其他实施方案包括FcγRIIa蛋白的三维结构，它基本上符合表1所列的原子坐标；
 5 FcγRIIa蛋白二聚体的三维结构，它基本上符合表2中所列的原子坐标；FcεRI蛋白的三维结构，它基本上符合表3中所列的原子坐标；FcεRI蛋白二聚体的三维结构，它基本上符合表4中所列的原子坐标；FcγRIIIb蛋白二聚体的三维结构，它基本上符合表5中所列的原子坐标及代表这些结构的模型。进一步地，本发明的实施方案还涉及一组FcγRIIa蛋白的三维坐标，这些坐标列于表1中；一组二聚体FcγRIIa蛋白的三维坐标，这些坐标列于表2中；一组FcεRI蛋白的三维坐标，这些坐标列于表3中；一组FcεRI蛋白的三维坐标，这些坐标列于表4中；一组FcγRIIIb蛋白的三维坐标，这些坐标列于表5中。
 10 本发明也包括使用这些结构(包括基于药物设计的结构)的方法，和衍生靶FcR结构的模型和图形的方法。

本发明的另一个实施方案是一种包含以晶体形式存在的 FcγRIIa 蛋白的组合物。本发明的另一个实施方案是一种包含以晶体形式存在的 FcεRI 蛋白的组合物。

本发明的另一个实施方案是培养 FcγRIIa 晶体的方法，该方法包括将
 20 FcγRIIa 蛋白与一种选自包含醋酸盐缓冲液和硫酸盐缓冲液的缓冲母液混合，诱导晶体形成以产生所述的 FcγRIIa 晶体。

本发明也包括培养FcεRI晶体的方法，该方法包括将 FcεRI 蛋白与一种选自包含醋酸盐缓冲液、二甲基砷酸钠缓冲液和柠檬酸钠缓冲液的结晶母液混合，诱导晶体形成以产生所述的 FcεRI 晶体。

25 本发明也包括一种治疗用的组合物，当将其用于动物时，能减少 IgG

介导的组织损伤，该治疗用的组合物包含一种抑制性的化合物，它能抑制 FcγRIIa 蛋白的活性，该抑制性化合物由包括如下几点的方法确定：(a) 提供 FcγRIIa 蛋白的三维结构，(b) 使用该三维结构设计化合物，该化合物选自抑制 FcγRIIa 与 IgG 结合的化合物、基本上模拟 FcγRIIa 蛋白三维结构的化合物和抑制 FcγRIIa 蛋白与一种刺激通过 FcγRIIa 蛋白的细胞信号传导的分子结合的化合物；(c) 化学合成该化合物；和(d) 评估合成的所述化合物减少 IgG 介导的组织损伤的能力。

本发明的另一个实施方案是提供一种治疗用的组合物，它能刺激动物体内的 IgG 体液免疫应答。本发明的另一个实施方案是提供一种治疗用的组合物，它能改善给予动物体内的抗体的治疗效果，通过调理作用或 FcγR-依赖的效应器作用（如抗体依赖的 FcγR 介导的细胞毒杀作用、巨噬细胞吞噬作用或细胞介质的释放）来治疗特定的疾病，如包括（但不限于）癌或传染性疾病（如通过口传染的 HIV、疱疹、细菌感染、酵母感染或者寄生虫感染）。这种治疗用的组合物包括一种或多种刺激性的化合物，它们增强了对 IgG 的结合，提高了 IgG 对 FcγR 的结合，增加了 FcγR 的二聚化的形成和/或增强了通过 FcγR 的信号传递。本发明也包括一种刺激体液免疫应答的方法。这种方法包含给动物给予本发明的治疗用组合物的步骤。

本发明也包括一种治疗用组合物，当将其给予动物时，能减少 IgG 介导的组织损伤，该治疗用化合物包含一种抑制性的化合物，它抑制 FcγRIIIb 蛋白的活性，该抑制性化合物由下面的方法来确定：(a) 提供 FcγRIIIb 蛋白的三维结构；(b) 使用该三维结构来设计化合物，这些化合物选自抑制 FcγRIIIb 蛋白与 IgG 结合的化合物，或基本上模拟 FcγRIIIb 蛋白三维结构的化合物，及抑制 FcγRIIIb 蛋白与一种刺激通过 FcγRIIIb 蛋白的细胞信号传导途径的分子的结合的化合物；(c) 化学合成所述化合物；



和(d)评估合成的化合物减少 IgG 介导的组织损伤的能力。

本发明的一个具体实施方案是提供一种治疗组合物，它能减少IgE介导的应答。该治疗用组合物能减弱因IgE介导的过敏性反应引起的IgE-介导的免疫应答、IgE-介导的炎症调制剂的释放或其他有关IgE-介导的与FcεR蛋白有关的炎症细胞的补充的生物机制。本发明的这种治疗用组合物能够：(1) 抑制（也就是阻止，或阻断）在有FcεR蛋白的细胞上（如肥大细胞）的FcεR蛋白与IgE免疫复合体的结合，这种抑制是通过干扰FcεR蛋白的IgE结合位点实现的；（2）抑制IgE或IgE免疫复合体的沉淀（也就是阻止两个IgE之间的Fc:Fc相互作用）；（3）通过干扰IgE与细胞表面受体的结合，抑制免疫球蛋白介导的细胞信号传导；（4）通过干扰细胞信号诱导分子（即能诱导通过FcεR蛋白的细胞信号传导的分子）与FcεR蛋白的结合来抑制FcεR介导的细胞信号传导。这种治疗用组合物包含一种或更多的抑制性化合物，该化合物能抑制IgE与FcεR蛋白之间的结合，抑制IgE对IgE，IgE对细胞表面受体的结合，或细胞信号诱导分子与FcεR蛋白的结合。本发明也包括减弱IgE介导的免疫应答，如IgE介导的炎症反应的方法。

本发明的另一个具体实施方案是提供一种治疗用组合物，它能刺激动物体的 IgE 体液免疫应答。本发明的另一个实施方案是提供一种治疗用组合物，其能改善抗体的治疗效果，该抗体是给予动物的，通过调理作用或 FcεR-依赖的效应器作用（如巨噬细胞的吞噬作用，或细胞介导因子释放）来治疗某些特定的疾病的。这种治疗用组合物包括一种或多种刺激性的化合物，它们提高了对 IgE 的结合能力，提高了 IgE 对 FcεRI 的结合能力，提高 FcεRI 形成二聚体的能力，和 / 或提高了通过 FcεRI 的细胞信号传导。本发明也包括刺激体液免疫应答的方法，该方法包括将本发明的治疗用组合物给予动物的给药步骤。

附图简介

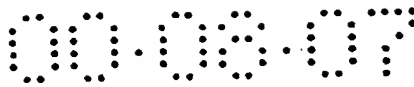


图 1 是对 PsFcγRIIa 蛋白质在纯化过程中的 SDS-PAGE 分析的扫描图。

图 2 是对纯化的 PsFcγRIIa 蛋白质的二维 NEPHGE 分析的扫描图。

图 3 是不同类型的人类免疫球蛋白 G 与纯化的 PsFcγRIIa 蛋白质结合的 Langmuir 点图。

图 4 是代表 PFcγRIIa 二聚体的示意图。

图 5 说明了在 FcγRIIa 结构域 1 和 2 中 β 片层(beta sheet)的位置, 及比较 FcγRII 的异质同晶的氨基酸序列。

图 6 是图 4 中的 FcγRIIa 结构的立体视图。

10 图 7 是 FcγRIIa 的参与和 IgG 结合的氨基酸的位置。

图 8 是 IgG 结合区的扩展视图, 其显示了参与结合的氨基酸的位置和侧链。

图 9 是 IgG 结合区的扩展视图, 其显示了当突变成丙氨酸时, 提高了 FcγRIIa 对 IgG 的结合能力的氨基酸。

15 图 10 展示了对形成二聚体有贡献的一个 FcγRIIa 单体的区域。

图 11 比较了 FcγRIIa 蛋白的氨基酸序列与 FcγRI、FcγRIIIb 和 FcεRI 蛋白的氨基酸序列。

图 12 比较了 FcγRIIa、FcγRI、FcγRIIIb 和 FcεRI 四种蛋白共同的结构特征。

20 图 13 是 FcγRIIa 和 FcεRI 蛋白的氨基酸序列的序列比较图。

图 14 是一个 FcεRI 单体结构的螺旋状展示的扫描图。

图 15 是一个 FcεRI 二聚体结构的螺旋状展示的扫描图。

图 16 是一个 FcεRI 二聚体模型的分子表面展示的扫描图。

图 17 是对一个为药物设计的 FcR 结构的靶位点的图形演示。

25 图 18 是 FcγRIIa 和 FcγRIIb 的氨基酸序列的序列比较图。

发明详述

本发明涉及如下发现：Fc受体（FcR）蛋白的三维结构、这种三维结构的模型、一种基于使用这种结构的药物设计方法、由这些方法确认的化合物、以及这些化合物在治疗用组合物中的使用。尤其，本发明涉及到Fcγ受体IIa（FcγRIIa）的新的结晶体、Fcε受体I（FcεRI）的新型结晶体、这些晶体的培养方法、FcγRIIa蛋白的三维坐标、一个FcγRIIa蛋白的三维结构、衍生于FcγRIIa结构的FcR结构和模型（包括FcεRI和FcγRIIb）、以及衍生了其他FcR结构的这些结构和模型的使用和在药物设计策略中的使用。需要说明的是，这里的术语“一”指的是一个或多个实体，例如，一个化合物指的是一个或多个化合物或至少是一个化合物。正因为这样，术语“一”、“一个或多个”和“最少一个”在这里经常可以替换使用。同样需要说明的是，术语“包含”、“包括”和“具有”也可替换使用。而且，“选自由……组成的群组”的化合物指的是紧跟其后列出的化合物中的一个或多个化合物，包括两个或多个化合物的混合（即组合）。根据这项发明，一个分离的或纯的蛋白质指的是从它的自然环境中提取出来的蛋白质。同样的，“分离的”或者“生物学上纯的”并不必然反映蛋白质纯到何种程度。这项发明中的一个分离的蛋白质可以从它的自然资源中获得，还能够使用DNA重组技术或化学合成方法产生。同样需要说明的是，术语“三（tertiary）”和“三维的”也能替换使用。另外，“FcR蛋白”也可简称为“FcR”，可以指完整的FcR蛋白或者FcR蛋白的一部分，如多肽，和/或FcR蛋白的一个单体或二聚体。特别地，当所指是例如一个单体或二聚体时，这个术语通常和FcR蛋白名连用。

制备 FcγRIIa 晶体结构的描述参见 1998 年 2 月 6 日公开的序列号为 60/073,972 的美国临时申请。序列号为 60/073,972 的美国临时申请全文在此引入作为参考。



本发明的一个具体实施方案为包括一个Fc受体的模型，该模型代表Fc受体(FcR)的三维结构。本发明的另一个实施方案包括FcR蛋白的三维结构。

本发明的FcR蛋白的三维结构基本上符合表1-5中任意之一列出的原子坐标。

根据本发明，使用“基本上符合”一词的意思是至少FcR蛋白的一个三维结

5 构的一部分，它在空间上与一组特定的原子坐标（如表1中所列出的）对应的三维结构的至少一部分足够地相似，使得可以根据某一特定的原子坐标（确定用于定义FcR蛋白三维结构所需的原子坐标）为基础（即通过分子替换），来模拟或计算FcR蛋白的三维结构。根据本发明，二聚体中的第一FcR的三维结构基本上符合代表第一FcR的三维结构的原子坐标，反之亦然。在第一种情况下，至少第一FcR蛋白（即蛋白二聚体的第一FcR单体）的结构的一部分基本上符合代表第二FcR单体的三维结构的原子坐标。在第二种情况下，一个第一单体FcR蛋白基本上符合第二FcR蛋白（即第二FcR蛋白二聚体的一个单体）的至少一部分。类似地，第一FcR的一给定的部分或链基本上符合代表另一第二FcR的三维结构的原子坐标的至少一部分。

15 特别地，一个基本上符合一个给定的原子坐标的结构是这样一种结构，其中至少约有50%的部分其每一结构域中的二级结构元件中的骨架原子至少具有小于约1.5Å的平均均方根偏差（RMSD）值，或者其每一结构域中的二级结构元件中的骨架原子具有小于1.3Å，或者，更优选小于1.0Å，或小于0.7Å，或小于0.5Å，最优选地，在其每一结构域中的二级结构元件中的骨架原子具有小于0.3Å的平均均方根偏差值。在更优选的实施方案中，一个基本上符合一组给定的原子坐标的结构是这样的结构，其中至少有75%的结构具有所引用的平均均方根偏差值（RMSD），更优选地，至少有90%的结构具有所引用的平均均方根偏差值（RMSD），最优选地，约有100%的结构具有所引用的平均均方根偏差值（RMSD）。在一个更优选的实施方案中，上

20

25 面定义的“基本上符合”可以扩展到包括氨基酸侧链的原子。就本发明使用

的，短语“共同的氨基酸侧链”是指那些氨基酸的侧链，它们与那些基本上符合一组给定的原子坐标的结构和那种实际上就是这种原子坐标的结构都是共同的。优选地，一个基本上符合一个给定原子坐标的三维结构是这样的结构，它至少有约50%的共同氨基酸的侧链有小于1.5Å的平均均方根偏差值
 5 (RMSD)；更优选地，小于1.3Å，更好的选择，小于约1.0Å，小于约0.7Å，小于约0.5Å，最好地，小于约0.3Å。优选地，基本上符合一个给定原子坐标的三维结构是这样的结构，它至少有约75%的共同氨基酸侧链有这里引用的平均均方根偏差值(RMSD)，更优选地，至少有约90%的共同氨基酸侧链有这里引用的平均均方根偏差值(RMSD)，更优选地，有约100%的共同
 10 氨基酸侧链有这里引用的平均均方根偏差值(RMSD)。

一个基本上符合特定的原子坐标的 FcR 蛋白的三维结构可以用合适的计算机建模程序如 MODELER [A. Sali 和 T.L. Blundell, 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.), 第 234 卷:779-815, 1993, 如应用 Insight II Homology 软件包[Insight II (97.0), MSI, 圣地亚哥]来模拟计算。这种模拟计算需
 15 要使用一些信息，如从下列数据衍生出来的信息：(1) FcR 蛋白的氨基酸序列；(2) 与具有三维结构的由特定的原子坐标组代表的蛋白的相关部分的氨基酸序列；(3) 特定的三维结构的原子坐标。与一特定的原子坐标基本上相符的 FcR 蛋白的三维结构也能够用如分子替代的方法来计算出，这将在下面予以详述。

20 在表1中列出了一个合适的用于模拟或计算另一个FcR蛋白的三维结构的FcR蛋白的三维结构所包括的原子坐标组。表1中的三维坐标组是按标准蛋白质数据库的格式表示的。根据本发明，选自FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIb、FcεRI和 FcαRI的FcR蛋白具有一种三维结构，它基本上符合表1所列的原子坐标组。在此使用的一种三维结构也可以是与一组原子
 25 坐标最可能的或最有效的匹配者。根据本发明，最可能的或最有效的匹配者

是指一特定的FcR蛋白具有的与一组从特定的FcR蛋白衍生而来的原子坐标相匹配者。这样的原子坐标可以例如从蛋白的晶体结构衍生出来，如这里确定的FcγRIIa结构对应的坐标，或如这里确定的FcεRI和FcγRIIb蛋白结构的模型衍生出来的坐标。譬如，一个单体FcγRIIa蛋白的三维结构，包括自然的或重组产生的FcγRIIa蛋白，其与表1的原子坐标基本上符合，也是最可能的匹配或最有效的匹配。本发明者确定的FcγRIIa的三维晶体结构包含表1的原子坐标。作为一个实例，FcεRI蛋白的三维结构基本上符合表1的原子坐标，也与表3的原子坐标基本上符合和最可能匹配，本发明者确定的FcεRI单体蛋白模型的三维结构包括表3的原子坐标。这个定义也可以相似的方式应用于其他的FcR蛋白。

根据本发明，FcR蛋白的一个优选的结构基本上符合表1中的原子坐标、B值和/或热力学参数。列于表1中的这些数据可以用本领域的一种技术予以解释。一个更优选的FcR蛋白的三维结构基本上符合表1中的三维坐标。更优选的FcR蛋白的三维结构是与表1中的原子坐标的最可能的匹配。确定一个基本上符合的和最可能的匹配的方法是本领域中的专门技术，在后面的实施例部分将予以详述。

一个优选的其三维结构基本上符合表1中的原子坐标的FcR蛋白包括这样一种FcR蛋白，当使用序列比较程序如DNAsis™程序(可获自Hitachi Software公司, San Bruno, CA)或MacVector™程序(可获自Eastman Kodak公司, New Haven, CT)或GCY™程序(可获自“GCY”，威斯康星大学, Madison, WI)，比较它们的氨基酸序列与FcγRIIa蛋白的氨基酸序列，优选的是下列这些氨基酸序列：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和/或SEQ ID NO:12时，它们的氨基酸序列至少有约25%，优选地，至少有约30%，更优选地，更优选地，至少有约40%，更优选地，至少有约50%，更优选地，至少有约60%，更优选地，至少有约70%，

更优选地，至少有约 80%，更优选地，至少有约 90%是相同的。通过靶 FcR 序列的全长序列，使用该比较程序附带的标准默认参数，可以进行这种序列比较。

本发明的一个具体实施方案包括 FcγRIIa 蛋白的一个三维结构。

- 5 FcγRIIa 蛋白的一个合适的三维结构基本上符合表 1 中的原子坐标。FcγRIIa 蛋白的一个合适的三维结构也基本上符合表 2-5 中所列的原子坐标。一个 FcγRIIa 蛋白的合适的三维结构也包括表 1 中所列的原子坐标组。FcγRIIa 蛋白的三维坐标组是按标准蛋白数据库格式表示的。优选的 FcγRIIa 蛋白的结构基本上符合表 1（对单体 FcγRIIa 而言）或表 2（对二聚体 FcγRIIa 而言）所列出的原子坐标、B 值和/或热力学参数。列于表 1 中的这些值可以用该领域的一种技术予以解释。一个更优选的 FcγRIIa 蛋白的三维结构具有与表 1 中所列三维坐标的最可能匹配。

- 本发明的一个具体实施方案包括 FcεRI 蛋白的一个三维结构。一个合适的 FcεRI 蛋白的三维结构基本上符合表 1、表 2、表 3、表 4 或表 5 中所列的原子坐标。更合适的 FcεRI 蛋白的三维结构基本上符合表 3（对单体 FcεRI 而言）或表 4（对二聚体 FcεRI 而言）的原子坐标。一个合适的 FcεRI 蛋白的三维结构也包括表 3 或表 4 中的原子坐标组。FcεRI 蛋白的三维坐标是按标准蛋白数据库格式表示的。这些表 1 — 5 中所列的坐标可以根据本领域的技术予以解释。FcεRI 的一个更优选的三维结构是与表 3 或表 4 中的三维坐标具有最可能的匹配者。本发明的一个实施方案包括一个 FcγRIIIb 蛋白的三维结构。一个合适的 FcγRIIIb 蛋白的三维结构基本上符合表 1、表 2、表 3、表 4 或表 5 中所列的原子坐标。更合适的 FcγRIIIb 蛋白的三维结构基本上符合表 5 所列的原子坐标组。一个合适的 FcγRIIIb 蛋白的三维结构也包括表 5 中的原子坐标组。FcγRIIIb 蛋白的三维坐标是按标准蛋白数据库格式表示的。更优选的 FcγRIIIb 蛋

白的三维结构具有与表 5 中的三维坐标最可能的匹配。任何一个 FcR 蛋白的三维结构都可以使用本领域中的通用技术来模拟，这些技术是基于从 FcγRIIa 晶体分析得到的和其他从 FcγRIIa 晶体衍生来的 FcR 结构得到的信息的。下面的实施例部分揭示了 FcγRIIa 晶体的产生，FcεRI 蛋白晶体的产生，从 FcγRIIa 晶体衍生而来的 FcγRIIa 蛋白单体和二聚体的三维结构，和 FcεRI 蛋白的单体和二聚体的三维结构模型，这些结构模型是利用本领域常规技术，在从 FcγRIIa 晶体分析得到的信息的基础上处理得到的。本发明的实施方案也包括晶体 FcR 的三维结构，如晶体 FcγRIIa 的结构，可被用来衍生任何其他的 FcR 三维结构，如这里展示的 FcεRI。

10 这种从 FcγRIIa 晶体结构衍生的 FcR（如 FcεRI）的三维结构可以被用来衍生其他的 FcR，如 FcγRIII 的三维结构。因此，关于晶体 FcγRIIa 和 FcγRIIa 的三维结构的新发现，使得可以使用本领域的一种常规技术来衍生任何 FcR 的三维结构和模型。任何 FcR 的结构的衍生甚至可以在没有关于 FcR 的晶体结构数据的情况下实现。且当有另一个 FcR 晶体结构时，使用已

15 有的从 FcγRIIa 结构得来的信息，可以对新的 FcR 的三维结构的模拟进行精化。本发明的一个优点是，在没有其他 FcR 蛋白的晶体结构数据时，考虑该其他 FcR 的氨基酸的差别，就可以模拟该 FcR 蛋白的三维结构。事实上，在本发明后的最近的发表的关于单体 FcεRI 结晶的报道和受体模型的公布[Garman 等，12 月 23 日，1998，细胞(Cell) 95:951-961]证实

20 了本发明者确定的包括表 3 的原子坐标的单体 FcεRI 蛋白的三维结构具有 Garman 等报道的关于 FcεRI 晶体三维结构的总体结构特征。尽管 Garman 等发表的晶体 FcεRI 结构的原子坐标现在还没有公开可用，但是一篇关于 Garman 等的结构演示和讨论提示 FcεRI 晶体的三维结构基本上符合表 3 中所列的原子坐标。而且，本发明的新发现使得基于结构的

25 药物设计化合物变得现实起来，这样设计出来的化合物有效地影响任何

真实的 FcR 的活性，特别是 FcγR 和 FcεRI 的活性。

晶体是与重原子化合物如Pt、Hg、Au和Pb的化合物或盐一起衍生的，分别对自然的和衍生的晶体进行X-射线衍射测定，收集数据。通过MIR[多同形替代法(multiple Isomorphous Replacement)]或SIRAS[单同形替代法(single Isomorphous Replacement)]方法，可以利用自然的晶体和衍生的晶体在衍射密度上的差别来确定这些数据的状态。对这些数据进行傅立叶变换，产生出蛋白质的低分辨的电子密度图。利用图象处理技术，可以对这些电子密度图进行修饰。根据电子密度图，产生出蛋白的分子模型。利用计算机程序（如XPLOR），可以对这种最初的（部分的）结构进行精化，通过修改描述结构的参数使得实际测定的和计算出来的衍射模式之间的差别达到最小，但使得模型仍然保持着符合已知的蛋白的几何与化学特性。可以计算出蛋白的新状态和对应的电子密度图。使用这种电子密度图为向导，可以人工对蛋白结构的分子模型进行改进。重复该程序产生蛋白的结构，其是由这里表1中的原子坐标组表示的FcγRIIa。

15 本发明的一个具体实施方案包括FcγRIIa蛋白的三维结构，其中FcγRIIa蛋白的原子坐标是用下面的方法产生的：（a）以晶体形式提供FcγRIIa蛋白；（b）产生晶体FcγRIIa蛋白的电子密度图；（c）分析电子密度图，产生原子坐标。

根据本发明，本发明的FcγRIIa蛋白的三维结构可以用来衍生出另一个FcR蛋白的三维结构的模型（也就是模拟的结构）。如在此使用的，蛋白的“结构”是指构成蛋白的那些成分及它们的排列方式。本发明使用的，“模型”一词是指将蛋白质、多肽或肽的三维结构通过具体的介质的做出来的一种形象的展示。譬如，一个模型可以用电子文件的方式，在计算机屏幕上、或在纸上（即在二维介质上）、和/或用球棍模型展示的一个三维结构。物理三维模型是具体的，它包括但是不限于棍模型（stick models）和空间结

25

构模型。“在计算机屏幕上图示模型”意思是指利用这些领域中大家都熟悉的适当的计算机硬件和软件技术，在计算机屏幕上表示（或演示）和操作该模型。这些技术可从多种来源获得，如犹他州盐湖城的Evans 和 Sutherland，及加州圣地亚哥的 Biosym Technologies公司。“提供一个模型图”一语是指产生该模型的硬拷贝的能力。硬拷贝包括可动的和静态的图片。计算机屏幕图形和图片可通过多种方式进行可视化，包括空间填充演示法、 α 碳原子示踪、格栏式图表（如图14，它是一个二维格栏式图表模型，代表人的Fc ϵ RI蛋白的三维结构）和电子密度图。

使用本发明的方法待模拟的合适的靶FcR结构包括与一种Fc γ RIIa蛋白在结构上基本上相关的任何FcR蛋白、多肽或肽，包括FcR蛋白的单体、二聚体和多聚体。与一种Fc γ RIIa蛋白在结构上基本上相关的一种优选的靶FcR结构包括一种靶FcR结构，当使用序列比较程序如DNAsisTM 程序（可获自Hitachi Software公司，San Bruno, CA）或MacVectorTM程序（可获自Eastman Kodak公司，New Haven, CT）或GC γ TM程序（可获自“GC γ ”，威斯康星大学，Madison, WI），比较它们的氨基酸序列与Fc γ RIIa蛋白的氨基酸序列，优选的是下列这些氨基酸序列：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14 和/或 SEQ ID NO:15时，它们的氨基酸序列至少有约25%，优选地，至少有约30%，更优选地，至少有约36%，更优选地，至少有约40%，更优选地，至少有约50%，更优选地，至少有约60%，更优选地，至少有约70%，更优选地，至少有约80%，更优选地，至少有约90%是相同的。通过靶FcR结构序列的全长序列，使用该比较程序附带的标准默认参数，可以进行这种序列比较。更优选的待模拟的靶FcR结构的蛋白质是，当把其优选的氨基酸序列，譬如结构域1或结构域2与任意一个下列这些氨基酸序列：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、

- 或SEQ ID NO:13相比较时, 其氨基酸序列有至少约50%, 优选地, 至少有约60%, 更优选地, 至少有约70%, 更优选地, 至少有约80%, 更优选地, 至少有约90%, 更优选地, 至少有约95%是相同的。更优选的待模拟的靶FcR结构包括这种结构, 包含FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIb、FcεRI或FcαRI蛋白,
- 5 更优选的, 包括氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:13的结构, 更优选包括氨基酸序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12, 或SEQ ID NO:13的结构。
- 10 待模拟的优选的靶FcR结构也包括, 但不限于, Fc受体的衍生物, 譬如有一个或更多的氨基酸残基被取代、缺失、或添加的Fc受体(即这里所谓的Fc受体突变体), 或通过核酸分子编码的Fc受体的自然等位基因变体来编码的蛋白。优选的待模拟的Fc受体蛋白包括FcγRIIaγTm(即缺失了跨膜结构域的FcγRIIa蛋白), 和突变体或核酸分子编码的FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、
- 15 FcγRIIc、FcγRIIIb、FcεRI、FcαRI蛋白的自然等位基因变体。待模拟的更优选的Fc受体蛋白包括那些蛋白, 他们具有下列氨基酸序列: SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:13, 或SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID
- 20 NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、或 SEQ ID NO:13的突变体或自然等位基因变体。根据本发明, FcγRIIb的一个氨基酸序列在此记为SEQ ID NO:5, FcγRIIc的一个氨基酸序列在此记为SEQ ID NO:6, FcγRI的一个氨基酸序列在此记为SEQ ID NO:7, FcγRIII的一个氨基酸序列在此记为SEQ ID NO:8, FcεRI的一个氨基酸序列在此记为SEQ ID NO:9(如图13所阐明的),
- 25 FcαRI的一个氨基酸序列在此记为SEQ ID NO:13。需要指出, 所有上面已知

的FcR的核苷酸与氨基酸序列都是已经知道的，且是公开可用的。待模拟的优选的等位基因的变体包括，但不限于，FcγRIIa等位基因变体，其在序列SEQ ID NO:3 的27位残基处有一个谷氨酰胺和SEQ ID NO:3的131位残基处有一个精氨酸，在此记为SEQ ID NO:10；在SEQ ID NO:3的27位残基处有一个色氨酸和SEQ ID NO:3的131位残基处有一个组氨酸，在此记为SEQ ID NO:11；或在SEQ ID NO:3的27位残基处有一个色氨酸和SEQ ID NO:3的131位残基处有一个精氨酸，在此记为SEQ ID NO:12。

本发明使用的，“天然等位基因变体”是指占据着同源染色体上相应基因座的不同基因形式。等位变体典型地编码这样的蛋白，它们和与之相比较的对应的基因编码的蛋白具有相似的活性。等位变体也可包含该基因的5' 或3' 非翻译区的变异（即在调控的控制区内）。等位变体对本领域的技术人员来说是很熟悉的，它们可在给定动物的编码Fc受体的给定基因组里发现。

本发明使用的，“编码 Fc 受体的核酸分子突变体”是指那些通过核苷酸插入、缺失、和/或替代修饰的核酸分子。优选地，一个 Fc 受体核酸分子突变体含有修饰，使得它编码的蛋白（即 Fc 受体的蛋白突变体）有一个或多个抗原决定簇，它们可被定点作用于非突变的 Fc 受体蛋白的体液或细胞免疫应答识别。更优选地，编码突变体 Fc 受体蛋白的核酸分子可以与编码非突变的 Fc 受体蛋白的核酸分子在严格的杂交条件下形成稳定的杂交体。更优选地，编码突变体 Fc 受体蛋白的核酸分子可以在严格的杂交条件下与编码下列氨基酸序列的核酸分子形成稳定的杂交体：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、或 SEQ ID NO:13。

本发明所述的严格的杂交条件指的是使用核酸分子来鉴定相似核酸分子的标准杂交条件。例如，Sambrook 等人发表了这些标准条件，见

Sambrook 等,《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning),冷泉港实验室出版社(Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press),1989年版。在此完整地将 Sambrook 等在 *ibid* 中的描述引入作为参考(具体参见第 9.31-9.62, 11.7 和 11.45-11.62 页)。另外,例如 Meinkoth 等人发表了在允许不同水平核苷酸错配的情况下进行杂交时,计算适当的杂交和清洗条件的公式;见 Meinkoth 等,1984, *Anal Biochem.* 138,267-284,在此完整地将 Meinkoth 等在 *ibid* 中的描述引入作为参考。

本发明所述的严格杂交条件,更特别地,指的是该条件允许分离出的核酸分子与杂交反应中用作探针的核酸分子具有的序列同一性至少为约 70%,更特别地至少为约 75%,最特别地至少为约 80%。这些条件依赖于形成的是 DNA:RNA 杂交物还是 DNA:DNA 杂交物而变化。计算获得的 DNA:DNA 杂交物的解链(melting)温度比 DNA:RNA 杂交物的解链温度小 10℃。在具体实施方案中,DNA:DNA 杂交物的严格杂交条件包括杂交时的离子强度为 0.1X SSC (0.157 M Na⁺),温度为大约 20℃~35℃,更优选为大约 28℃~40℃,最优选为大约 35℃~45℃。在具体实施方案中,DNA:RNA 杂交物的严格杂交条件包括杂交时的离子强度为 0.1X SSC(0.157 M Na⁺),温度为大约 30℃~45℃,更优选为大约 38℃~50℃,最优选为大约 45℃~55℃。这些值是基于核酸分子的解链温度计算而得的,该核酸分子大于大约 100 个核苷酸,甲酰胺含量为 0%,G+C 含量为 50%。作为选择,T_m 值可以如 Sambrook 等人提出的作经验上的计算,如上,第 11.55-11.57 页。

利用一种 FcR 蛋白(例如 FcγRIIa)的已知三维结构和另一种 FcR 靶结构之间的保守结构特征,可以得到本发明的一种模型。这些结构特征包括而限于氨基酸序列、保守的二硫键、以及在免疫球蛋白超家族成员中高度保守的 β-链或 β-折叠片。例如,图 5、图 11 和图 12 说明了

不同 Fc 受体蛋白的线性氨基酸序列和 β -链之间的关系。优选地，从 Fc γ RIIa 蛋白的三维结构骨架出发获得本发明的一种模型。在与 Fc γ RIIa 蛋白氨基酸序列残基不同的位置，根据靶 FcR 结构的氨基酸序列替换个别的氨基酸残基。注意使这种残基的替换不影响骨架的三维结构。虽然构建靶 FcR 结构模型的方法在本领域中被普遍了解，但本发明提供了 Fc γ RIIa 蛋白的第一三维结构，以及基本上涉及 Fc γ R 受体家族成员、Fc ϵ RI 和 Fc γ RIIRb 的蛋白的第一三维结构。因此，本发明提供了一些基本信息，由此可获得 Fc γ R 受体家族成员、Fc ϵ RI 受体和 Fc α RI 受体的精确的、因此是有用的模型。如上面所讨论的，一旦从第一个 FcR（比如本文发表的 Fc γ RIIa 的三维结构）得到第二个 FcR 的三维结构，则第二个 FcR 的三维结构就可以用来获得（即模拟或计算）另一个 FcR 的三维结构。

根据本发明，可以使用通常的技术来构建结构模型，例如见 Sali, Current Opinions in Biotechnology, 第 6 卷, 第 437-451 页, 1995; 可以使用程序包如 Homology 95.0 (见 Program Insight II, 获自 Biosym/MSI 公司, 圣地亚哥, 加州) 来完成算法。使用 Homology 95.0 需要将具有已知三维结构的已知结构的氨基酸序列与要构建模型的靶结构的氨基酸序列进行对比。这种对比可以是成对的对比，或者为提高精确度可以是包括其它相关序列的多序列对比(普遍使用的方法，如 Rost, Meth. Enzymol., 第 266 卷, 第 525-539 页, 1996)。通过比较相关的结构特征、或者检测已知结构和靶结构之间的序列同源性水平，可以鉴定出结构保守区。可以利用已知结构来给靶结构的一些坐标赋值。可以利用获自蛋白数据库的已知结构片段产生靶结构的其它区域的坐标，这些蛋白数据库比如来自于 Brookhaven 国家实验室, Upton, 纽约。可以根据空间上允许的构象，利用旋转异构体数据库以及构象的出现频率来给靶结构侧链构象赋值(见 Poder 和 Richids, 分子生物学杂志 (J.Mol.Biol.) 第 193 卷, 第 775-791

页,1987)。可以通过分子力学(例如收录于 Program Discover 的,获自 Biosym/MSI 公司)对获得的靶结构模型进行精练,以确保模型在化学上和构象上是合理的。

因此,本发明的一个实施方案是一种构建靶 FcR 结构的三维结构模型的方法,其包括:(a)提供 FcγRIIa 蛋白的氨基酸序列和靶 FcR 结构的氨基酸序列;(b)鉴定 FcγRIIa 蛋白氨基酸序列和靶 FcR 结构氨基酸序列共有的结构保守区;(c)为得到靶结构氨基酸序列的三维结构模型,可以对比靶 FcR 结构的结构保守区和 FcγRIIa 蛋白的三维结构,该三维结构基于的原子坐标基本上与表 1 所列的原子坐标一致。前面叙述了根据本发明得到的一种模型。优选地,该模型包括一种计算机模型。该方法还可以包括电子模拟结构比较的步骤,以获得靶结构氨基酸序列三维结构的计算机模型。用以建模的合适的靶结构包括蛋白质、多肽和此处公开的 Fc 受体肽,包括这些受体的单体和二聚体。本文公开了优选建模的氨基酸序列。

本发明的另一个实施方案是一种构建靶 FcR 三维结构计算机模型的方法,该靶 FcR 结构的晶体已经得到(本文称为“晶体化的靶结构”)。构建这种模型的合适的方法包括分子替换。分子替换的方法为本领域的技术人员所普遍了解(见 Brunger, Meth. Enzym., 第 276 卷,第 558-580 页,1997; Navaza 和 Saludjian, Meth. Enzym.,第 276 卷,第 591-594 页; Tong 和 Rossmann, Meth. Enzym.,第 276 卷,第 594-611 页;以及 Bently,Meth. Enzym.,第 276 卷,第 611-619 页,1997,此处完整将以上每一文献都引入作为参考),该过程的完成可以通过软件程序,例如 XPLOR。根据本发明,收集晶体化靶结构晶体的 X 射线衍射资料。将 X 射线衍射资料进行转换来计算帕特森(Patterson)函数。比较晶体化靶结构的帕特森函数与从已知结构(此处称为搜索结构)计算而得的帕特森函数。晶体化靶结

构的帕特森函数围绕搜索结构的帕特森函数旋转以确定晶体化靶结构在晶体中的正确方向。然后计算变换函数来确定靶结构相对于晶体各个轴的位置。一旦晶体化靶结构在单位晶胞中被正确定位，就可以计算实验资料的初相。这些初相对于电子密度图的计算和结构的精化是必需的，

- 5 由电子密度图可以观察到结构上的差异。优选地，搜索分子的结构特征（如氨基酸序列、保守的二硫键、 β —链或 β —片层）与晶体化靶结构相关。优选地，根据本发明用于分子替换方法中的结晶化靶 FcR 结构与所搜索结构（如 Fc γ RIIa）具有的氨基酸序列一致性为至少大约 25%、更优选地为至少大约 30%、更优选地为至少大约 40%、更优选地为至少大约 50%、更优选地为至少大约 60%、更优选地为至少大约 70%、更优选地为至少大约 80%、以及更优选地为至少大约 90%，两种氨基酸序列的比较使用本文叙述的 DNA 对比软件。本发明中一个优选搜索结构包括一种 Fc γ RIIa 蛋白，其含有的氨基酸序列包括：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:15。
- 10 本发明中一个更优选的搜索结构包括一种 Fc γ RIIa 蛋白，其三维结构基本上与表 1 中所列的原子坐标一致。优选地，从本发明的 Fc γ RIIa 晶体 X-射线衍射导出晶体化 Fc γ RIIa 蛋白的帕特森函数。本发明的分子替换方法中优选的靶 FcR 结构包括：Fc γ RI、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIII、Fc ϵ RI 和/或 Fc α RI，最优选的是 Fc ϵ RI 和 Fc γ RIIb。

- 20 本发明一个优选的实施方案包括获得晶体化靶 FcR 结构(即晶体化 FcR 蛋白)的三维结构的方法，该方法包括步骤：(a) 比较晶体化靶 FcR 结构的帕特森函数和晶体化 Fc γ RIIa 蛋白的帕特森函数，以获得该晶体化靶 FcR 结构的电子密度图；以及 (b) 分析电子密度图以获得晶体化靶 FcR 结构的三维结构。

- 25 本发明的另一个实施方案是确定靶结构的三维结构的方法，其中靶



FcR 结构的三维结构是未知的。这种方法用来确定与 FcγRIIa 蛋白的三维结构相关的结构，这一方法只基于靶结构的三维结构。因此，这种方法能够确定那些结构，它们与 FcγRIIa 蛋白没有很高的氨基酸一致性，但是有三维结构的相似性。一个优选的确定靶 FcR 结构的三维结构的方法包括：(a) 提供靶结构的氨基酸序列，其中靶结构的三维结构是未知的；(b) 通过折叠识别分析三维构象中氨基酸序列的折叠方式；以及(c)比较靶结构氨基酸序列的折叠方式与 FcγRIIa 蛋白的三维结构以确定靶结构的三维结构，其中 FcγRIIa 蛋白的三维结构基本与表 1 中列出的原子坐标一致。优选的折叠识别的方法包括被通常叙述的那样，见 Jones, Curr. Opin. Struc. Biol., 第 7 卷, 第 377-387 页, 1997。可以基于靶结构的疏水和/或亲水特征分析这种折叠。

本发明的一个实施方案包括 FcR 蛋白三维结构的一种三维计算机图象。在此公开了一些已构建出三维计算机图象的合适结构。优选地，用来构建计算机图象的结构应基本上与表 1 中所列的三维坐标一致。构建本发明的计算机图象可以采用任意合适的软件程序，包括但不限于 MOLSCRIPT2.0(Avatar Software AB 公司, Heleneborgsgatan 21C, SE-11731, 斯德哥尔摩, 瑞典), 图形显示程序 O(Jones 等, Acta Crystallography, 第 A47 类, 第 110 页, 1991)或图形显示程序 GRASP。用于构建本发明图象的合适的计算机硬件为本领域的技术人员所了解。优选的计算机硬件是 Silicon 图形工作站。

本发明的另一个实施方案涉及由一三维坐标组编码构成的计算机可读的介质，该三维坐标组选自表 1 中列举的三维坐标、表 2 中列举的三维坐标、表 3 中列举的三维坐标、表 4 中列举的三维坐标、和表 5 中列举的三维坐标，其中，使用图形展示软件程序，在能将这些电子文件表示为图象的计算机上，由这些三维坐标创建的电子文件是可视的。优选

地, 这些三维结构是选自 FcγRIIa、FcεRI 和 FcγRIIIb 的 FcR 蛋白。

而本发明的另一个实施方案涉及由一三维坐标组编码构成的计算机可读的介质, 该三维坐标与表 1 中列举的三维坐标基本上一致, 其中, 使用图形展示软件程序, 在能将这些电子文件表示为图象的计算机上, 由这套三维坐标创建的电子文件是可视的。优选地, 这些三维结构是选自 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIII、FcεRI 和 FcαRI 的 FcR 蛋白。

本发明的另一个实施方案涉及 FcR 的二维图象, 包括在图 4、图 6、图 7、图 8、图 9、图 10、图 14、图 15 或图 16 中所描述的。这些图象大多数用 MOLSCRIPT 2.0 软件(Avatar Software AB 公司, Heleneborgsgatan 21C, SE-11731, 斯德哥尔摩, 瑞典)画出的。

本发明的一个实施方案包括 FcR 蛋白的一种图象, 该图象是通过在计算机上分析一个三维坐标组而获得的, 该三维坐标组包括表 1 中所列举的三维坐标, 使用图形展示软件程序来获得该图象的电子文件, 在能将该电子文件表示为三维图象的计算机上查看该文件。合适的图形展示软件包括 MOLSCRIPT 2.0, 图形显示程序 O 和图形显示程序 GRASP。合适的显示该图象的计算机包括 Silicon 图形工作站。本文公开了合适的用于作图的结构和模型。优选地, 这些三维结构和/或模型是选自 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIII、FcεRI 和 FcαRI 的 FcR 蛋白。

本发明还包括了靶结构的三维结构的三维模型, 包括 FcγRI 蛋白、FcγRIIa 蛋白、FcγRIIb 蛋白、FcγRIIc 蛋白、FcγRIIIb 蛋白、FcεRI 蛋白和 FcαRI 蛋白, 获得所述三维模型的方法包括: (a) 提供 FcγRIIa 蛋白的氨基酸序列和靶 FcR 结构的氨基酸序列; (b) 鉴定 FcγRIIa 氨基酸序列和靶 FcR 结构的氨基酸序列共有的结构保守区; (c) 对比靶 FcR 结构与 FcγRIIa 蛋白三维结构的结构保守区, 确定 FcR 蛋白的原子坐标,

以获得靶 FcR 结构氨基酸序列的三维结构模型, FcγRIIa 三维结构所基于的原子坐标基本上与表 1 中列举的原子坐标一致。优选该模型包括一种计算机模型。优选地, 该方法还包含电子模拟结构对比的步骤以获得靶 FcR 结构氨基酸序列的三维结构的计算机模型。本发明公开了优选的氨基酸序列: FcγRI 蛋白、FcγRIIb 蛋白、FcγRIIc 蛋白、FcγRIIIb 蛋白和 FcεRI 蛋白。

本发明的一个实施方案包括制备 FcγRIIa 晶体的方法, 其包括将 FcγRIIa 蛋白与母液结合, 且包括诱导晶体形成以获得 FcγRIIa 晶体。本发明的另一个实施方案包括制备 FcεRI 晶体的方法, 其包括将 FcεRI 蛋白与母液结合, 且包括诱导晶体形成以获得 FcεRI 晶体。尽管本发明特别叙述了获得 FcγRIIa 和 FcεRI 晶体的过程, 可以理解, 本领域的技术人员可以利用本文所叙述的这些方法获得其它 Fc 受体(FcR)的晶体, 特别是 FcγRI、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIb 和 FcαRI, 本发明也包括了它们的三维结构。

15 优选地, 形成 FcγRIIa 结晶时使用的溶液在母液中含有的 FcγRIIa 蛋白为大约 1mg/ml-20mg/ml, 更优选为大约 2mg/ml-15mg/ml, 更优选为大约 3mg/ml-6mg/ml。优选地, 形成结晶使用的液滴每 3 μl 含有的 FcγRIIa 蛋白为大约 1μg-30μg, 更优选地为大约 5μg-25μg, 更优选地为大约 4.5μg-9μg。

20 本发明合适的母液包括醋酸盐缓冲液。本发明优选的醋酸盐缓冲液包括醋酸盐溶液。结晶前缓冲液中的醋酸铵浓度可以为大约 100-500mM 的醋酸铵。优选地, 缓冲液中的醋酸铵浓度为大约 150-300mM 的醋酸铵。更优选地, 缓冲液中的醋酸铵浓度为 200mM 的醋酸铵。优选地, 合适的醋酸盐缓冲液的 pH 值为从大约 5-7, 更优选地为大约 5.5-6.5, 更优选地为大约 5.6。优选地, 使用柠檬酸钠控制本发明的醋酸盐缓冲液的 pH 值。

合适的醋酸盐缓冲液含有 0.01M 的柠檬酸钠，更优选地含有 0.05M 的柠檬酸钠，更优选地含有 0.1M 的柠檬酸钠。合适的醋酸盐缓冲液含有任意的聚乙二醇（PEG），更优选 PEG 4000。~~本发明醋酸盐缓冲液中合适的 PEG 4000 的浓度~~ 包括 PEG 4000 浓度为大约 20%，更优选为大约 25%，
5 更优选为大约 30%。

~~本发明一种合适的母液包括硫酸盐缓冲液~~。本发明优选的硫酸盐缓冲液包括硫酸锂溶液。结晶前缓冲液中的硫酸锂浓度可以为大约 100mM-2M 的硫酸锂。优选地，缓冲液中的硫酸锂浓度为大约 500mM-2M 的硫酸锂。更优选地，缓冲液中的硫酸锂浓度为大约 1.5M 的硫酸锂。优选地，合适
10 的硫酸盐缓冲液的 pH 值为从大约 5-9，更优选地为大约 6-8，更优选地为大约 7.5。优选地，使用 HEPES 控制本发明的硫酸盐缓冲液的 pH 值。合适的硫酸盐缓冲液含有 0.01M 的 HEPES，更优选地含有 0.05M 的 HEPES，更优选地含有 0.1M 的 HEPES。

可以用几种方法诱导过饱和的 FcγRIIa 蛋白溶液形成晶体，包括但不限于
15 局限于蒸汽扩散、液体扩散、分批结晶、恒温 and 温度诱导或其结合。优选地，通过蒸汽扩散（即悬滴法）来诱导过饱和的 FcγRIIa 蛋白质溶液结晶。在蒸汽扩散法中，FcγRIIa 蛋白和本发明的母液结合，其将导致 FcγRIIa 蛋白质溶液过饱和，在恒定的温度下形成结晶。蒸汽扩散法进行的温度优选控制在大约 15°C-30°C，更优选在大约 20°C-25°C，更优选在
20 22°C 的恒定温度。

在优选实施方案中，本发明包括一种获得 FcγRIIa 结晶的方法，其包括：
（a）在醋酸盐缓冲液中制备大约 3mg/ml 的 FcγRIIa 蛋白质溶液以形成过饱和溶液，其中缓冲液包含大约 200mM 的醋酸铵，大约 10mM 的柠檬酸钠和大约 30% 的 PEG 4000，pH 值大约为 5.8；（b）将大约 3μl
25 的过饱和溶液滴在盖玻片上，将其于倒置在含有大约 1ml 醋酸盐缓冲液

的小池上；以及（c）保温培养直至形成 FcγRIIa 晶体。

在另一个优选实施方案中，本发明包括一种获得 FcγRIIa 结晶的方法，其包括：（a）在硫酸盐缓冲液中制备大约 3mg/ml 的 FcγRIIa 蛋白质溶液以形成过饱和溶液，其中缓冲液包含大约 0.15M 的 HEPES，大约 1.5M 的硫酸锂，pH 值大约为 7.5；（b）将大约 3μl 的过饱和溶液滴在盖玻片上，将其于倒置在含有大约 1ml 硫酸盐缓冲液的小池上；以及（c）保温培养直至形成 FcγRIIa 晶体。

如上所概要讨论的，本发明的另一个实施方案是制备 FcεRI 结晶的方法，以及用此法制备的 FcεRI 结晶。优选地，形成 FcεRI 结晶所使用的溶液在母液中含有的 FcεRI 蛋白大约为 1-20mg/ml，更优选大约为 2-15mg/ml，更优选大约为 3-6mg/ml，更优选为 3mg/ml 和 6mg/ml。优选地，形成结晶所使用的液滴每 3μl 液滴含有的 FcεRI 蛋白大约为 1-30μg，更优选为 5-25μg，更优选为 4.5-9μg，

本发明合适的母液包括醋酸盐缓冲液。本发明优选的醋酸盐缓冲液包括醋酸钙缓冲液。结晶前缓冲液中的醋酸钙浓度可以为大约 100-500mM 的醋酸钙。优选地，缓冲液中的醋酸钙浓度为大约 150-300mM 的醋酸钙。更优选地，缓冲液中的醋酸钙浓度为 200mM 的醋酸钙。优选地，合适的醋酸盐缓冲液的 pH 值可以是大约 5.5-7.5，更优选地为大约 6.0-7.0，更优选地为大约 6.5。优选地，使用二甲基胍酸钠控制本发明的醋酸盐缓冲液的 PH 值。合适的醋酸盐缓冲液含有约 0.01M 的二甲基胍酸钠，更优选地含有 0.05M 的二甲基胍酸钠，更优选地含有 0.1M 的二甲基胍酸钠。合适的醋酸盐缓冲液含有任意的聚乙二醇（PEG），更优选 PEG 8000。本发明的醋酸盐缓冲液中合适的 PEG 8000 的浓度，包括 PEG 8000 浓度为大约 10% w/v，更优选为大约 15% w/v，更优选为大约 20% w/v。

本发明的另一种合适的母液包括一种含有二甲基胍酸钠、2-丙醇

和聚乙二醇的缓冲液。本发明优选的二甲基胍酸钠缓冲液，在结晶前的缓冲中含有的二甲基胍酸钠的浓度可以为大约 0.01M 的二甲基胍酸钠，更优选含有 0.05M 的二甲基胍酸钠，更优选含有 0.1M 的二甲基胍酸钠。合适的二甲基胍酸钠缓冲液具有的 pH 值优选为大约 5-7，更优选地为大约 5.5-6.5，更优选地为大约 5.5-6.0。合适的二甲基胍酸钠缓冲液含有的 2-丙醇浓度为大约 5% v/v，更优选为 7% v/v，更优选为 10% v/v。合适的二甲基胍酸钠缓冲液含有任意的聚乙二醇（PEG），更优选 PEG 4000。本发明醋酸盐缓冲液中合适的 PEG 4000 的浓度可以为大约 10% w/v，更优选为大约 15% w/v，更优选为大约 20% w/v。

10 本发明的另一种合适的母液含有柠檬酸钠缓冲液，其包括二水柠檬酸三钠、二甲基胍酸钠和 2-丙醇。本发明优选的柠檬酸钠缓冲液在结晶前含有大约 0.05M 的二水柠檬酸三钠，更优选含有 0.1M 的二水柠檬酸三钠，更优选含有 0.2M 的二水柠檬酸三钠。合适的柠檬酸钠缓冲液的 pH 值优选为大约 5.5- 7，更优选为大约 6.0-7.0，更优选为大约 6.5。本发明
15 优选的柠檬酸钠缓冲液，在结晶前的缓冲液中含有的二甲基胍酸钠浓度可以为大约 0.01M 二甲基胍酸钠，更优选含有 0.05M 的二甲基胍酸钠，更优选含有 0.1M 的二甲基胍酸钠。合适的柠檬酸钠缓冲液含有的 2-丙醇浓度为大约 15% v/v，更优选为 20% v/v，更优选为 30% v/v。

可以用几种方法诱导过饱和的 FcεRI 蛋白溶液形成晶体，包括但不限于
20 局限于蒸汽扩散，液体扩散，分批结晶，恒温 and 温度诱导或其结合。优选地，通过蒸汽扩散（即悬滴法）来诱导过饱和的 FcεRI 蛋白质溶液结晶。在蒸汽扩散法中，FcεRI 蛋白和本发明的母液结合，将导致 FcεRI 蛋白质溶液过饱和，在恒定的温度下形成结晶。蒸汽扩散法进行的温度优选控制在大约 15°C-30°C，更优选在大约 20°C-25°C，更优选在 22°C 的恒
25 定温度。

在优选实施方案中，本发明包括一种获得 FcεRI 结晶的方法，其包括：（a）在醋酸盐缓冲液中制备大约 3mg/ml 的 FcεRI 蛋白质溶液以形成过饱和溶液，缓冲液中包含大约 200mM 的醋酸钙，大约 100mM 的二甲基胍酸钠和大约 18% w/v 的 PEG 8000，pH 值大约为 6.5；（b）将大约 3 μl 的过饱和溶液滴在盖玻片上，将其于倒置在含有大约 1ml 醋酸盐缓冲液的小池上；以及（c）保温培养直至形成 FcεRI 晶体。

在另一个优选实施方案中，本发明包括一种获得 FcεRI 结晶的方法，其包括：（a）在二甲基胍酸钠缓冲液中制备大约 3mg/ml 的 FcεRI 蛋白质溶液以形成过饱和溶液，缓冲液中包含大约 100mM 的二甲基胍酸钠，大约 20% w/v 的 PEG 8000，pH 值大约为 5.5-6.0；（b）将大约 3 μl 的过饱和溶液滴在盖玻片上，将其于倒置在含有大约 1ml 硫酸盐缓冲液的小池上；以及（c）保温培养直至形成 FcεRI 晶体。

在另一个优选实施方案中，本发明包括一种获得 FcεRI 结晶的方法，其包括：（a）在柠檬酸钠缓冲液中制备大约 3mg/ml 的 FcεRI 蛋白质溶液以形成过饱和溶液，缓冲液中包含大约 200mM 的二水柠檬酸三钠、大约 100mM 的二甲基胍酸钠和大约 30% v/v 的 2-丙醇，pH 值大约为 6.5；（b）将大约 3 μl 的过饱和溶液滴在盖玻片上，将其于倒置在含有大约 1ml 硫酸盐缓冲液的小池上；以及（c）保温培养直至形成 FcεRI 晶体。

本发明中可以使用任何分离的 FcR 蛋白。分离的 FcR 蛋白质可以来自天然环境或者由重组 DNA 技术（例如，聚合酶链式反应(PCR)扩增、克隆）生产，或者来自化学合成。为获得重组 FcR 蛋白，可以将编码 FcR 蛋白的核酸分子插入任何能将核酸分子导入宿主细胞的载体中，此处公开了导入本发明重组载体中的合适和优选的核酸分子。本发明优选的核酸分子编码了人的 FcR 蛋白，更优选地，编码人的 FcγRIIa 蛋白、人的 FcεRI

蛋白、或者人的 FcγRIIb 蛋白。本发明的核酸分子编码 FcR 蛋白的任何部分，优选 FcR 蛋白的全长，更优选可溶性的 FcR 蛋白（即，能被产生这种蛋白质的细胞分泌出的那种 FcR 蛋白）。在重组载体中，特别是在重组分子中，更优选的核酸分子所编码的蛋白质具有下列氨基酸序列：

5 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、或 SEQ ID NO:13。重组分子中的优选的核酸分子包括 sFcγRIIa 和 sFcεRI，实施例部分叙述了它们的产物。

10 本发明的重组载体可以是 RNA 或 DNA，可以是原核生物的或真核生物的，且典型的是一种病毒或者质粒。优选地，将编码 FcR 蛋白质的核酸分子插入到包括表达载体的载体中以形成重组分子。此处所指的表达载体可以是能够转化宿主细胞和影响特定的核酸分子表达的 DNA 或 RNA 载体。本发明的表达载体包括任何在本发明的重组细胞中起作用（即控制基因表达）的载体，包括在细菌、真菌、内寄生物、昆虫、其他动物、和植物细胞。本发明优选的表达载体控制昆虫细胞中的表达。本发明更优选的表达载体包括 pVL1932 杆状病毒穿梭质粒。本发明优选的重组分子包括 pVL-sFcγRIIa (a)、pVL-sFcγRIIa(b)和 pVL-sFcεRI。

20 本发明的表达载体可以转化成任何合适的宿主细胞中以形成重组细胞。合适的宿主细胞包括能表达插入表达载体中的核酸分子的细胞。例如原核生物表达载体可以转化到细菌宿主细胞中。本发明优选的宿主细胞包括能表达棒状病毒的细胞，特别是昆虫细胞，优选 *Spodoptera frugiperda* 或者 *Trichoplusia ni* 细胞，本发明优选的重组细胞包括 *S. frugiperda*:pVL- sFcγRIIa (a)/ pVL- sFcγRIIa (b)细胞和 *S. frugiperda*:pVL-sFcεRI，它们的构建过程如本文所述。

25 用于制备 FcR 晶体的 FcR 蛋白的分离方法包括从表达这种 FcR 蛋白

的重组细胞培养物中回收重组蛋白。在一个实施方案中，在有效的能够生产该蛋白的条件下培养能表达该蛋白的细胞，回收该蛋白质，从而制备分离出本发明的一种重组 FcR 蛋白。优选培养本发明的重组细胞。有效的培养条件包括但不限于，有效的培养基、生物反应器、温度、pH 和氧条件，培养基能够允许该蛋白质的生产。这些培养条件在本领域的普通技术人员的专业范围内。实施例部分包括了合适的条件。

优选地，本发明的重组细胞表达分泌形式的 FcR 蛋白质。纯化本发明的 FcR 蛋白可以使用各种标准的蛋白质纯化技术，例如但不限于，亲和层析、离子交换层析、过滤、电泳、疏水作用层析、凝胶过滤层析、反相层析、层析聚焦和分级溶解。优选地，使用这种方法来纯化 FcR 蛋白，纯化的蛋白质完全可用于晶体的制备，以获得与 FcR 蛋白三维结构有关的信息。优选地，FcR 蛋白组合物的纯度为大约 70%，更优选为 80%，更优选为 85%，更优选为 90%。

在一个实施方案中，从细胞培养物上清液中纯化的重组 FcR 蛋白，收获上清液的时间为传染后约 20-60 小时，更优选为传染后的 30-50 小时，更优选为传染后大约 40 小时。优选地，从上清液中纯化的 FcγRIIa 蛋白的方法包括，步骤 (a) 将从 *S. frugiperda*:pVL- sFcγRIIa (a) /pVL- sFcγRIIa (b) 细胞获取的上清液加到离子交换柱上；(b) 从离子交换柱收集未结合的蛋白质，将未结合蛋白质加到免疫亲和层析柱上；(c) 洗脱结合在免疫亲和层析柱上的蛋白质，将洗脱的蛋白质加到从凝胶层析柱上；以及 (d) 从凝胶层析柱上收集经过滤的蛋白质以获得 FcγRIIa 蛋白。优选地，从上清液中纯化 FcεRI 蛋白的方法包括，步骤 (a) 将从 *S. frugiperda*:pVL- sFcεRI 细胞获取的上清液加到离子交换柱上；(b) 从离子交换柱收集未结合的蛋白质，将未结合蛋白质加到免疫亲和层析柱上；(c) 洗脱结合在免疫亲和层析柱上的蛋白质，将洗脱的蛋白质加到凝胶层析柱上；以及 (d) 从凝

胶层析柱上收集经过滤的蛋白质以获得 FcεRI 蛋白。

鉴于人 FcγR 蛋白质和 FcγR 蛋白质家族的其它成员有高度的氨基酸序列同源性，本发明的纯化方法也可用于 FcR 家庭的每个成员。另外，本领域的技术人员可以认识到本发明的纯化方法可普遍用于纯化任何 FcR 蛋白质，比如 FcεRI 蛋白，只是在免疫亲和层析纯化步骤要使用 IgE 而非 IgG，又比如 FcαRI 蛋白，只是在纯化步骤要使用 IgA 而非 IgG。分离的 FcγR 蛋白家族成员，FcεR 蛋白和 FcαR 蛋白可以获自重组 DNA 技术或纯化自天然来源，其包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜曙红粒细胞、血小板和 B 淋巴细胞（即 B 细胞）。实施例部分叙述了分离的 FcγRIIa 和 FcεRI 蛋白的重组产物。

本发明的另一实施方案包括一种组合物，该组合物含有结晶形式的 FcR 蛋白质（即 FcR 晶体）。此处所使用的术语“晶体化 FcR”和“FcR 晶体”都是指结晶的 FcR，它们将会被交替使用。优选地，晶体化 FcR 是使用本文所叙述的晶体形成方法获得的，特别是根据实施例 6 和实施例 9 中所公布的方法。本发明的 FcR 晶体可以包括任何晶体结构，优选如正交晶体沉淀。本发明合适的晶体化 FcR 包括 FcR 蛋白的单体或多聚体。优选的晶体化 FcR 包括非对称单位中的 FcR 蛋白质。更优选的晶体化 FcR 包括 FcR 蛋白质的二聚体。

本发明的具体实施方案包括一种组合物，该组合物含有 FcγRIIa 蛋白质的结晶形式（即 FcγRIIa 蛋白质晶体）的组分。此处所使用的术语“晶体化 FcγRIIa”和“FcγRIIa 晶体”都是指结晶的 FcγRIIa 蛋白质，它们将会被交替使用。优选地，晶体化 FcγRIIa 是使用本文所叙述的晶体形成方法获得的，特别是根据实施例 6 中所公布的方法。本发明的 FcγRIIa 晶体可以包括任何晶体结构，优选如正交晶体沉淀。优选地，本发明的组合物包括以晶体形式排列的 FcγRIIa 蛋白分子，其是以空间组 P2₁2₁2 晶



体形式排列的 FcγRIIa 蛋白,从而形成单位晶胞尺度为 $a=78.80\text{\AA}$ 、 $b=100.55\text{\AA}$ 、 $c=27.85\text{\AA}$ 。本发明的优选的晶体提供了 X-射线衍射资料,这些衍射资料可用于在大约 3.0\AA 的解析度下,优选在 2.4\AA 的解析度下,更优选在 1.8\AA 的解析度下,确定 FcγRIIa 蛋白的原子坐标。

- 5 本发明合适的晶体化 FcγRIIa 包括 FcγRIIa 蛋白的单体和多聚体。优选的晶体化 FcγRIIa 包括非对称单位中的一个 FcγRIIa 蛋白。更优选的晶体化 FcγRIIa 包括 FcγRIIa 蛋白的二聚体。

本发明的另一具体实施方案包括一种组合物,该组合物含有以结晶形式存在的 FcεRI 蛋白质(即 FcεRI 晶体)的组分。此处所使用的术语“晶体化 FcεRI”和“FcεRI 晶体”都是指结晶的 FcεRI 蛋白,它们将会被交替使用。优选地,晶体化 FcεRI 是使用本文所叙述的晶体形成方法获得的,特别是根据实施例 9 中所公布的方法。本发明的 FcεRI 晶体可以包括任何晶体结构,优选如正交晶体沉淀。本发明合适的 FcεRI 晶体包括 FcεRI 蛋白的单体或多聚体。优选的晶体化 FcεRI 包括非对称单位中的一个 FcεRI 蛋白质。更优选的晶体 FcεRI 包括 FcεRI 蛋白质的二聚体。

根据本发明,晶体化 FcR 可用于确定本发明的化合物结合 FcγRIIa 蛋白的能力,本发明的基于结构的药物设计的方法。优选地,将 FcγRIIa 晶体浸于含有本发明化合物的溶液中,然后通过本领域的方法标准来测定化合物与晶体的结合。

- 20 本发明的一个实施方案是提供治疗用组合物。本发明的一种治疗用组合物包含一种或多种的治疗用化合物。本发明优选的治疗用化合物包括抑制性化合物和促进性化合物。

本发明的一个实施方案是一种治疗用合物,它能够减轻 IgG 介导的组织损伤。合适的治疗用组合物能减少 IgG 介导的组织损伤,这种组织损伤来自 IgG 介导的过敏性或其他生物学机制,该机制涉及到 IgG 介导的与

FcγR 蛋白有关的炎症细胞的补充。例如，本发明的一种治疗用组合物包括：（1）通过干扰 FcγR 蛋白的 IgG 结合位点，抑制（即防止、阻断）在有 FcγR 蛋白的细胞（如 B 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜曙红粒细胞或血小板细胞）上，FcγR 蛋白结合到 IgG 免疫复合体上。（2）结合到 IgG 的 Fc 部位，通过干扰 IgG 分子的补体结合位点，以抑制补体固定；（3）抑制 IgG 或 IgG 免疫复合物的沉淀（即防止两个 IgG 之间的 Fc: Fc 相互作用；（4）通过干扰 IgG 与细胞表面受体的结合，抑制免疫球蛋白介导的细胞信号传导；（5）通过干扰细胞信号诱导分子（即一个诱导通过 FcγR 蛋白的细胞信号传导的分子）与 FcR 蛋白的结合，抑制 FcγR 介导的细胞信号传导；（6）通过抑制结合病原体的 IgG 与吞噬细胞（例如，防止抗体依赖性病毒感染增强(ADE)，例如黄病毒和登革热病毒）上的 FcγR 蛋白的结合，抑制病原体的调理作用；以及（7）抑制病毒分子（例如麻疹病毒核壳体蛋白）结合到 FcγR 蛋白上。此处所用的术语“免疫复合体”指的是抗体与可溶性抗原结合所形式的复合体。此外所用的“补体固定”指的补体激活，其是通过抗原导致炎症细胞补充的抗原：抗体复合体形成的，典型的是通过组合包含 C3a 和 C5a 的复合体、或裂解 C4 的形成物形成的。此处所用的术语“结合位点”指的是分子（例如蛋白质）的一个区域，另一个分子特异性结合到该区域。这些治疗用组合物包含一种或多种抑制性化合物，该化合物抑制 IgG 与 FcγR 蛋白、IgG 与补体、IgG 与 IgG、IgG 与细胞表面受体、细胞信号诱导分子与 FcγR 蛋白、FcγR 蛋白与病毒的结合，或者抑制调理作用。本发明中还包括减轻 IgG 介导的组织损伤的方法。该方法包括本发明的治疗用组合物的动物给药步骤。

本发明的另一个实施方案是提供刺激动物中 IgG 体液免疫反应的治疗用组合物。而本发明的另一个实施方案是通过调理作用或者依赖于 FcγR 的效应器作用（例如，抗体依赖的 FcγR 介导的细胞毒性、吞噬作

用或细胞介质的释放)，增加给予动物治疗用的抗体的治疗效果的治疗组合物，具体的适应于治疗的疾病，包括但不限于，肿瘤或感染性疾病（例如，HIV 口腔感染、疱疹、细菌感染、酵母感染或寄生虫感染）。该治疗用组合物包括一种或多种刺激性化合物，该化合物可提高对 IgG 的结合，增强 IgG 对 FcγR 的结合，增强 FcγR 的二聚体的形成和/或增强通过 FcγR 的信号传导。本发明还包括了促进体液免疫应答的方法。该方法也包括本发明的治疗用组合物的动物给药步骤。

本发明的合适的抑制化合物是与 FcγR 蛋白直接相互作用的化合物，优选 FcγRIIa 蛋白或 FcγRIIb 蛋白，它们能抑制 IgG 与 FcγR 蛋白的结合，其是通过或者阻断 FcγR 的 IgG 结合位点（此处指的是底物类似物）或者通过修饰 FcγR 蛋白的其它区域（比如 FcγR 二聚体的单体间 IgG 结合裂隙的上部沟槽，二聚体相互作用的表面，每一单体上的 D1 和 D2 间的凹陷或铰链区，和/或由 FcγR 二聚体的单体形成的下部沟槽中的 IgG 结合裂隙的下部），使 IgG 不能与 FcγR 结合（例如通过变构相互作用）。FcγR 底物类似物指的是与 FcγR 蛋白的 IgG 结合位点相互作用（如结合、联合、修饰）的化合物。FcγR 底物类似物可以如含有化合物，该化合物能够模拟 IgG 的 Fc 部分，或者特异地结合到 FcγR 的 IgG 结合位点，但是不模拟 IgG 的 Fc 部位。本发明的抑制性化合物也可以包括一种化合物，该化合物能基本上模拟结合到 IgG 上的至少 FcγRIIa 蛋白的一个部位（此处指的是模拟肽化合物）。本发明的其它的合适的抑制性化合物包括抑制 FcγR 蛋白结合到细胞信号传导诱导分子而不是 IgG 上的化合物。这些细胞信号诱导分子的例子包括另一个 FcγR（即形成 FcγR 蛋白的二聚体）、或细胞表面附着分子、细胞内附着分子或病毒（例如，麻疹病毒核壳蛋白）。

本发明的一个实施方案是提供一种治疗用组合物，它能够减轻 IgE 介

导的反应。合适的治疗用组合物能减少 IgE 介导的反应,这种反应来自 IgE 介导的过敏性, IgE 介导的炎症调制剂的释放或其他生物学机制, 该机制涉及到 IgE 介导的与 FcεR 蛋白有关的炎症细胞补充。例如, 本发明的一种治疗用组合物包括: (1) 通过干扰 FcεR 蛋白的 IgE 结合位点, 抑制(即防止、阻断)在有 FcεR 蛋白的细胞(如肥大细胞)上的 FcεR 蛋白结合到 IgE 免疫复合体上; (2) 抑制 IgE 或 IgE 免疫复合体的沉淀(即防止两个 IgE 之间的 Fc: Fc 相互作用; (3) 通过干扰 IgE 与细胞表面受体的结合, 抑制免疫球蛋白介导的细胞信号传导;和(4) 通过干扰细胞信号诱导分子(即一个诱导通过 FcεR 蛋白的细胞信号传导的分子)与 FcR 蛋白的结合, 抑制 FcεR 介导的细胞信号传导。这些治疗用组合物包含一种或多种抑制性化合物, 该化合物能抑制 IgE 与 FcεR 蛋白、IgE 与 IgE、IgE 与细胞表面受体、或者细胞信号诱导分子与 FcεR 蛋白的结合。本发明中还包括减轻对 IgE 介导的反应的方法,例如 IgE 介导的炎症。该方法包括本发明的治疗用组合物的动物给药步骤。

15 本发明的另一个实施方案是能刺激动物中 IgE 体液免疫反应的治疗用组合物。而本发明的另一个实施方案是通过调理作用或者依赖于 FcεR 的效应器作用(例如,吞噬反应或细胞介质的释放), 改进给予动物治疗用的抗体的治疗效果的治疗用组合物。这种治疗用组合物包括一种或多种刺激性化合物, 该化合物可提高对 IgE 的结合, 增强 IgE 对 FcεRI 的结合, 增强 FcεRI 的二聚体的形成和/或其他增强通过 FcεRI 的信号传导。20 本发明还包含了促进体液免疫反应的方法。该方法包括本发明的治疗用组合物的动物给药步骤。

本发明的合适的抑制化合物是与 FcεR 蛋白直接相互作用的化合物, 因此它们能抑制 IgE 与 FcεR 蛋白的结合, 通过或者阻断 FcεR 的 IgE 结合位点(此处指的是底物类似物)或者通过修饰 FcεR 蛋白的其它区域(比25

如 FcεRI 二聚体的**单体间** IgE 结合裂隙的上部沟槽，二聚体相互作用的表面，每一单体上的 D1 和 D2 间的凹陷或铰链区，和/或由 FcεRI 二聚体的单体形成的**下部沟槽**中的 IgE 结合裂隙的下部），使 IgE 不能与 FcεR 结合(例如通过变构相互作用)。FcεR 底物类似物指的是与 FcεR 蛋白的 IgE 结合位点相互作用（如结合、联合、修饰）的化合物。FcεR 底物类似物可以是如包含化合物，该化合物能够模拟 IgE 的 Fc 部分，或者特异地结合到 FcεR 的 IgE 结合位点，但是不模拟 IgE 的 Fc 部位。本发明的抑制性化合物也可以包括一种化合物，该化合物基本上模拟结合到 IgE 上的至少 FcεR 蛋白一个部位（此处指的是模拟肽化合物）。本发明的其它的合适的抑制性化合物包括抑制 FcεR 蛋白结合到细胞信号传导诱导分子而不是 IgE 上的化合物。这些细胞信号诱导分子的例子包括另一个 FcεR（即形成 FcεR 蛋白的二聚体）、或细胞表面的附着分子、细胞内附着分子或病毒（例如，麻疹病毒核壳蛋白）。

本发明的抑制性化合物可以通过本领域技术人员所知的各种方法鉴定。例如将抑制性化合物与 FcR 蛋白结合，或者相互作用，可以在溶液中或细胞上的 FcR 蛋白来确定，使用，例如免疫分析如酶联免疫吸附分析（ELISA）和放射性免疫分析（RIA）或结合分析如 Biaocore 分析。基于细胞的分析可以包括，例如，细胞分裂素（cytokine）（如 IL-4、IL-6 或 IL-12）分泌分析，或细胞内信号传导分析，该分析可以用来测定例如蛋白或脂磷酸化、介质释放或当 FcR 结合细胞信号诱导分子时的细胞内 Ca^{++} 流动。

本发明所述的合适的激发性治疗用化合物具有下述特性：与天然 FcR 蛋白(例如，从天然环境中分离的 FcR 蛋白)相比，其结合 Ig 的能力得到改进，而且也包括能够增强 Ig 与其 FcR 的结合或者通过 FcR 增强信号传导的化合物。本发明的激发性化合物可以用下述功能来加以鉴别：（1）能够以比天

然FcR蛋白更高的水平与Ig结合或相互作用；（2）能够增强Ig与其FcR的结合；（3）增强FcR二聚体的形成，其是通过结合或是FcR、结合FcR的Ig或是Ig与FcR的结合体；和/或（4）通过FcR 增强信号传导。与结合例如天然FcR蛋白相比，Ig结合本发明所述的激发性化合物的能力增强，对其进行测定的方法包括结合分析，用结合分析来测定Ig与激发性化合物以及天然FcR蛋白的结合稳定性、亲合力或动力学。这类方法为本领域技术人员所熟知并且公开于本发明的实施例部分。本发明所述的激发性化合物还可以包括具有下述性能的化合物：与Ig或FcR蛋白结合从而增强Ig与FcR蛋白的结合力，或者修饰FcR 上的Ig结合位点或Ig中结合FcR蛋白的Fc片段，通过变构相互作用修饰Ig或FcR蛋白的其他区域，从而改进了Ig和FcR蛋白结合过程中或结合后的细胞信号传导。本发明所述的另一种激发性化合物可以包括具有下述特性的化合物：能够在Ig不存在的条件下，以能够激发FcR-介导的细胞信号传导的方式结合FcR蛋白。

本领域技术人员可以理解到：如同上面对FcγR蛋白与IgG以及FcεRI与IgE描述的那样，抑制或激发性化合物还可以根据任意一种FcR及其Ig配体的结构来设计。

根据本发明，本发明所述的合适的治疗用化合物包括：肽或其他有机分子，以及无机分子。合适的有机分子包括小的有机分子。优选地，当将本发明所述的治疗用化合物给动物施用，该化合物对动物无害（例如，无毒）。肽是指分子量小并且在水解时能生成2个或多个氨基酸的一类化合物。所述多肽包括2个或多个肽。如本发明使用的那样，蛋白质包括一个或多个多肽。设计的优选的治疗用化合物包括：“L”和/或“D”氨基酸组成并被设计为正常或向后反向的（retroinverso）肽的肽、肽模拟化合物、有机小分子、或其同源或异源-多聚物，其构型为线形或分枝状。

本发明所述治疗用化合物的设计可以使用基于结构的药物设计方法。

在发现本发明的三维结构之前，没有任何信息可以用于以FcR蛋白结构为基础的治疗用化合物的结构开发中。迄今为止，还不能从已有的线性氨基酸序列信息从头完成这类合理的开发设计。基于结构的药物设计是指用计算机模拟来预测一种肽、多肽、蛋白质的构象，或者肽或多肽与一种治疗用化合物之间构象的相互作用。例如，通常，就一种能与治疗用化合物有效地相互作用的蛋白质而言，需要将该治疗用化合物的三维结构推想为一种相容构象以确保化合物能够以结合时可获得期望结果的方式与所述蛋白质结合。所述蛋白质的三维结构知识可保证本领域技术人员能设计出具有此类相容构象的治疗用化合物。例如，FcγRIIa蛋白的IgG结合位点的三维结构知识能使本领域技术人员设计出一种能结合FcγRIIa的治疗用化合物，该化合物稳定并且能导致抑制生物应答，例如IgG与具有FcγR的细胞结合，或者此类结合时的细胞信号传导。此外，例如，FcγRIIa蛋白的IgG结合位点的三维结构知识能使本领域技术人员设计出一种FcγRIIa蛋白的底物类似物。

本发明公开了可用于基于结构的药物设计的合适的结构和模型。用于基于结构的药物设计方法中的优选的模型是包括FcγRIIa蛋白结构、FcεRI蛋白结构、FcεRIIIb蛋白结构和靶FcR结构的模型。用于基于结构的药物设计方法中的优选的靶结构模型包括用本发明公开的任意一种方法制备的模型，包括分子替代以及折叠识别相关方法。

本发明的一个实施方案是生物活性化合物的基于结构的药物设计计算机辅助方法，其中包括：(a)提供一种蛋白质结构，其包括本发明的一种FcR蛋白三维结构或一种模型；(b)用三维结构或模型设计一种化合物；以及(c)化学合成该化合物。另外，这种方法还可以包括下述步骤：(d)评估合成的化合物的生物活性。本发明还公开了所述FcR蛋白及模型所采用的合适的三维结构。根据本发明，所述设计步骤可以包括制备一种新型化合物或者对已知化合物数据库进行筛选（例如，位于一种含有已知化合物三维结

构的计算机筛选数据库中的化合物)。也可以通过模仿在某些结构特征上进行了部分替代的化合物来进行设计。设计的步骤包括根据化合物的已知功能来选择化合物。优选的设计步骤包括用计算机筛选化合物的一个或多个数据库,在数据库中通过计算机可知道化合物的三维结构以及其同FcR蛋白的三维结构相互作用(例如,锚定、排列、匹配、接触)(例如 Humblet和Dunbar, Animal Reports in Medicinal chemistry, 第28卷, 第275-283页, 1993, M Venuti, ed., Academic Press中所述的方法)。合成合适的化合物的方法为本领域的技术人员所熟知,且依赖于所合成化合物的结构。评估合成化合物的生物活性的方法取决于化合物的生物活性(例如,抑制或激发),并且该方法公开于本发明中。

各种其他的基于结构的药物设计方法公开于Maulik等, 1997, 分子生物技术(Molecular Biotechnology):治疗应用及策略(Therapeutic Applications and Strategies), Wiley-Liss, Inc., 在此将其整体引入作为参考。Maulik等公开了,例如,定向设计的方法,该方法中使用者通过从含有选定片段的片段文库中制备出新型分子来定向实施该方法;或者随机设计方法,该方法中使用者使用一种基因或其他算法随机突变片段及其结合体并且同时应用一种筛选标准来评估候选片段的适合度;以及一种基于网格(grid-based)的方法,该方法中使用者计算三维受体结构与小片段探针之间相互作用的能量,随后把合适的探针位点连接在一起。

优选地,本发明所述的能结合FcR蛋白的Ig结合位点的化合物是已知的,并且源于具有下述特征的化合物,即其化学结构和/或立体化学结构与FcR蛋白和/或Ig互补的化合物。所述互补就是化合物的特征,该化合物可在形状或化学基团分布上与受体表面匹配而且能结合FcR蛋白从而促进或抑制Ig与FcR蛋白的结合,或者诱导结合FcR蛋白时的细胞信号传导。更优选地,一种能够结合FcR蛋白上Ig结合位点的化合物的相关亲合力至少约为 10^{-6} M,

而且更优选与至少约 10^{-8} M的亲合力相关。

优选地，FcR蛋白上的5个位点是基于结构的药物设计的目标所在。这些位点包括FcR蛋白的Ig结合位点，两个FcR单体之间的上部沟槽，两个FcR蛋白单体之间的二聚化界面，两个FcR单体之间的下部沟槽，FcR蛋白的结构域1和结构域2之间的界面、裂隙或铰链区域，以及这些位点的结合（例如，与单体之间的Ig结合位点以及上部沟槽之间同时作用）。图17中显示了这些位点的图解表示，其中“a”代表FcR蛋白上的Ig结合位点，“b”代表两个FcR单体之间的上部沟槽，“c”代表两个FcR蛋白单体之间的二聚化界面，“d”代表FcR的结构域1和结构域2之间的界面、裂隙或铰链区域，“e”代表两个FcR单体之间的下部沟槽。下面的讨论提供了使用FcR的靶位点进行药物设计的具体细节，并参照FcγRIIa结构上的优选靶位点作为实施例。但是，应该理解的是本领域技术人员使用本发明提供的FcεRI结构和FcγRIIIb结构的描述，能够有效地筛选出可用于基于结构的药物设计的FcεRI单体及二聚体上的类似靶位点。此外，目前能根据本发明提供信息模拟出其他FcR蛋白的本领域技术人员，同样也可以有效地筛选到其他可用于基于结构的药物设计的FcR蛋白上的类似靶位点。

以Ig-结合位点(图 17; "a") 为目标定向影响FcR与Ig的结合 (即，抑制或增强)。例如，FcγRIIa 蛋白的IgG结合位点包括，但不限于，SEQ ID NO:3 中的残基155、156、158-160、113-116、129、131、133 和134，而且还可以包括上述第二个位点(图 17; "b")中的至少一部分，生成FcγRIIa蛋白二聚体时两个IgG结合位点间形成的沟槽。来自包含在IgG结合中的位点“b”的残基包括，但不限于，SEQ ID NO:3中的残基117-121、125-129、150-154和157-161。用于基于结构的药物设计的合适靶位点包括FcγRIIa蛋白的IgG 结合位点，示于图7中。更具体地，诱变研究已经鉴定出了几个能影响IgG 结合的残基，而且本发明公开的三维结构清楚地鉴定出该残基暴露于表面（即

可能参与了IgG 结合而不仅具有变构效应)。这些残基可以分成3个空间基团: (1) Phe129、His131、Lys113、Pro114、Leu115、Val116; (2) Pro134 和 Asp133; 以及(3) Leu159和 Ser161。基团(1)形成一个从沟槽“b”的边缘延续通过结合表面“a”的连续表面(图17), 并且是IgG 结合位点设计工作的最优选目标。基团(2)通过Leu132与基团(1)隔开, 该残基在IgG 结合中的重要性目前还不得而知, 而且很可能是表面暴露残基的一部分。基团(3)包括远离另两个基团的残基, 而且似乎并不能通过二聚结构来参与与IgG的结合。

可以两个FcR单体之间的上部沟槽(图 17; "b") 为目标定向影响FcR与Ig的结合 (即, 抑制或增强)。与以平坦的蛋白表面为目标不同, 上述上部沟槽附加了一个吸引位点。FcγRIIa 蛋白的二聚结构表明可以C2 或伪C2对称抑制物为目标。FcγRIIa蛋白中的优选目标残基包括Lys117、His131、Phe129、Asn154、Ser161、Leu159、Thr152和Phe121, 其中Phe129、Lys117 和His131为最优选残基。在一个实施方案中, 能够设计出可与上部沟槽“b”以及IgG结合表面“a”二者同时相互作用的化合物。例如, 可以通过设计能够流出沟槽并能与上述结合表面“a”结合的调控化合物, 得到改进了的Ig调控化合物。替代地, 能与“b”结合的调控化合物可从空间上阻碍IgG与“a”的结合而不让其与“a”的结合表面真正作用。

以受体二聚体界面 (图 17; "c") 为目标, 定向影响两个FcR蛋白形成二聚体的能力, 从而通过这两个FcR蛋白或其中之一影响细胞信号传导。不受理论的束缚, 本发明人认为二聚体的形成能够影响细胞信号传导或者与参与二聚体形成的这两个FcR蛋白或其中之一结合的Ig的构象, 从而影响细胞信号传导。此外, 二聚体界面是一种极好的靶位点, 这是由于一个单体可以为另一个单体提供配体信息, 反之亦然。图10给出了一种可用于基于结构的药物设计的合适的靶位点, 其中包括两个FcγRIIa 蛋白之间的二聚化界面。

更具体地说，残基117-131和残基150-164组成了FcγRIIa二聚体的交界区域，而且出自这些序列的肽或其模拟物可以是具有结合能力的抑制物。对FcγRIIa晶体结构中氢键作用的测试表明交界面中几乎没有单体间的相互作用，但是分布着一个由六聚肽Phe121-Gln122-Asn123-Gly124-Lys125-Ser126形成的明显团簇。此外，在包括Gly124-Ser561和Ser126-Leu559的单体之间形成了一个氢键。另外，还存在着由Lys125侧链与Phe121苯环之间的形成的一些疏水性接触。

以结构域1和2之间的界面(图 17; "d")为目标，影响IgG 与FcγRIIa蛋白之间的结合。本发明人发现，在FcγRIIa蛋白的三维结构中，结构域1与结构域2紧密接触。具体地说，结构域1中的包括SEQ ID NO:3中第17-20位残基的一个环与结构域2中的环接近，形成了IgG-结合位点中的至少一部分。与IgG的相互作用被认为发生于接近D1D2界面的地方，以致这一位点上的取代能够影响Ig 的结合。此外，残基12-14 (基底)、6-10和 77-80 (D1 面) 以及93-96和101 (D2面)形成一个裂隙，因此成为一个可用于抑制物设计的潜在位点。一个可用于基于结构的药物设计的合适靶位点包括FcγRIIa蛋白中的结构域1和2之间的界面，该位点示于图5中。

另外，以两个 FcR单体之间的下部沟槽 (图 17; "e")为目标，定向影响FcR与Ig之间的结合 (即，抑制或增强)。如同上面有关上部沟槽"b"的描述那样，可以将一种类似的设计策略用于该位点，尽管还不清楚结合该位点的化合物是抑制物还是更可能增强IgG 与 FcγR之间的结合。

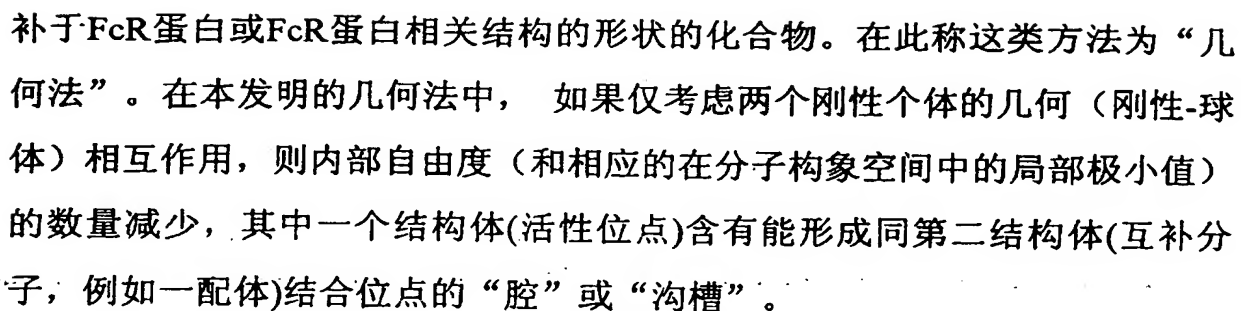
上面具体描述的药物设计策略涉及FcγRIIa单体及二聚体的残基和区域，可以类似地将该策略用于其他的FcR结构，包括本发明公开的FcγRIIIb 和 FcεRI 结构。使用本领域认可的模拟程序及药物设计方法，其中许多已公开于本发明中，本领域普通技术人员能够根据例如其他FcR中氨基酸序列的差异及更有利的结构，对FcγRIIa设计策略加以改进，能够类似地设计出可调

控其他FcR作用的化合物。此外，本领域技术人员还可以使用从一种FcR，例如FcγRIIa蛋白衍生而来的导向化合物结构，并同时考虑另一种FcR蛋白，例如FcεRI中的氨基酸残基差异，修饰FcγRIIa 导向化合物从而设计出用于调节FcεRI 蛋白的导向化合物结构。例如，可以通过把FcγRIIa 导向化合物结构中的酸性部分改变成一个电子缺陷酮部分，来安排上部沟槽药效基团中的His131>Tyr131。

在本发明的基于结构的药物设计方法中，不必将一种候选化合物（即，例如用本发明所述计算机筛选方法分析的一种化合物）与靶位点中的每个残基排列对比。合适的候选化合物可对应于为靶位点描述的一亚套（subset）残基。优选地，一种候选化合物包括一种构象，该构象能促进靶位点与候选化合物之间共价或非共价交联形成。优选一种候选化合物能够结合邻接于靶位点的一个表面，从而在复合体中提供一个附加的位点。设计一种拮抗物（即，一种能通过封锁结合位点或界面从而抑制配体与FcR蛋白之间结合的化合物）时，该拮抗物应该以足够的亲合力与结合位点结合，或者基本阻止配体（即，一种能特异性地结合目标位点的分子）与目标区域的结合。本领域技术人员应该认识到，候选化合物与靶位点间的互补不必覆盖此处所有特定的残基，以便抑制或促进配体的结合。

通常，具有空间化学互补的化合物的设计可以采用能从化学或几何学上优化化合物与靶位点之间的“配合”的技术来完成。这类技术公开于，例如，Sheridan和venkataraghavan, Acc. Chem Res., 第20卷, 第322页, 1987; Goodford, 医学化学杂志 (J. Med. Chem.), 第27卷, 第557页, 1984; Beddell, Chem. Soc. Reviews, 第279卷, 1985; Hol, Angew. Chem., 第25卷, 第767页, 1986; 以及Verlinde和Hol, 结构 (Structure), 第2卷, 第577页, 1994, 所有文献在此引入作为参考。

本发明的一个用于基于结构的药物设计的实施方案包括鉴定出一种互



几何方法由Kuntz等在分子生物学杂志 (J. Mol. Bid.) , 第161卷, 第269页, 1982中描述, 在此整体引入作为参考。用于化合物设计的算法可以使用软件程序DOCK 包, 版本1.0 (购自 Regents of the University, 加利福尼亚) 来完成。依照Kuntz 算法, 结合位点或界面的结构 (例如FcγRIIa 蛋白) 表面的腔或沟槽的形状限定为一系列具有不同半径的重叠球形。然后搜寻一个或多个现存的晶体数据库 (例如由University Chemical Laboratory, 剑桥大学, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, 英国, 维护的Cambridge Structural Database System) 或由Brookhaven 国立实验室维护的蛋白数据库, 来得到同上述限定形状接近的化合物。

可以对用几何方法得到的化合物进行修饰，以满足同化学互补性相关的标准，例如氢键形成、离子相互作用或范德华相互作用。

本发明基于结构的药物设计的另一实施方案包括，测定化学基团（“探针”）同环绕结合位点或界面或在其内部的取样位置上的活性位点间的相互作用，得到一系列能量值，从而在选定的能量水平处得到三维的轮廓表面。

20 该方法在此称为“化学探针法”。用于本发明化合物设计的化学探针方法由，例如，Goodford在医学化学杂志（J. Med. Chem.），第28卷，第849页，1985中描述的，在此将其整体引入作为参考，其可以用合适的软件包执行，包括，例如，GRID（获自Molecular Discovery Ltd., Oxford OX2 9LL，英国）。在开始

25 开始时对位点互补分子化学前提的鉴定可通过用例如（如表1中所示的原子坐标）不同的化学探针，如水、甲基基团、氨基氮、羧基氧和/或羟基来探测FcyRIIa

蛋白的活性位点。测定探针与活性位点相互作用的优先位点。利用得到的此类位点的三维图谱可用以产生假定的互补化合物。

5 本发明的一个治疗用组合物包含一或多个本发明的治疗用化合物。一个治疗用组合物可进一步包含能够降低Ig介导的反应或增加体液免疫反应的其它化合物。例如，本发明的一个用于减轻组织损伤的治疗用组合物也包括通过例如阻断补体固定法、外渗、阻断病毒蛋白同FcR的结合、阻断调理作用或加强正常和被动性抗体免疫等方式能够阻断炎症细胞补充的化合物。本发明的一个用于降低Ig介导的炎症的治疗用组合物可包括能够阻断炎症细胞补充和/或阻断能导致释放炎症介质的信号传导通路化合物。

10 本发明的一个用于增强体液应答的治疗用组合物也可包括能增强针对一抗原（即，佐剂）的抗体产生的化合物，包括但不限于细胞因子、化学因子和能够诱导细胞因子和化学因子（例如，粒细胞巨噬细胞菌落刺激因子（GM-CSF）、粒细胞菌落刺激因子（G-CSF）、巨噬细胞菌落刺激因子（M-CSF）、菌落刺激因子（CSF）、促红细胞生成素（EPO）、白细胞介素2（IL-2）、白细胞介素3（IL-3）、白细胞介素4（IL-4）、白细胞介素5
15 （IL-5）、白细胞介素6（IL-6）、白细胞介素7（IL-7）、白细胞介素8（IL-8）、白细胞介素10（IL-10）、白细胞介素12（IL-12）、干扰素 γ 、干扰素 γ 诱导因子I（IGIF）、转化生长因子 β 、RANTES（调控激活，由正常T细胞表达和可能分泌）、巨噬细胞炎症蛋白（例如MIP-1 α 和MIP-1 β ）、细菌成分（例
20 如内毒素，尤其是超抗原，外毒素和细胞壁成分）、铝盐、钙盐、硅石、多核苷酸、类毒素、血清蛋白、病毒包覆蛋白、阻断共聚物佐剂（例如，Hunter's TitermaxTM 佐剂(VaxcelTM, Inc. Norcross, GA)、Ribi 佐剂(Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)和皂素及它们的衍生物（例如Quil A (Superfos Biosector A/S, 丹麦)。

25 本发明的一个用于治疗动物疾病的治疗用组合物包括将此组合物用

合适的方法对动物给药，使得能够获得预期的治疗效果。优选用于治疗
的动物包括哺乳动物、有袋类、爬行类和鸟类，对人类而言的动物包括
宠物、用做食物的动物、动物园动物和其它相关的经济动物（例如赛马
和皮毛有价值的动物如果鼠和貂）。更优选的用于治疗的动物包括人、
5 狗、猫、马、牛、绵羊、猪、鸡、鸵鸟、食火鸡（emus）、火鸡、科拉
熊和袋鼠。特别优选保护的动物为人、狗和猫。

本发明的一个优选治疗用组合物也包括一赋形剂、佐剂和/或载体。合
适的赋形剂包括治疗动物可以忍受的化合物。这样的赋形剂例子包括水、盐
水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、汉克氏（Hank's）溶液和其他水相生理平衡
10 盐溶液。也可使用非水相的载体，例如固定油类、芝麻油、油酸乙酯或甘油
三酯。其他有用的成分包含含有粘度增强剂如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡
聚糖的悬浮液。赋形剂也可含有少量的添加剂，例如可加强等渗性和化学稳
定性的物质。缓冲液的例子包括磷酸盐缓冲液、二碳酸盐(bicarbonate)缓冲
液和Tris缓冲液，而防腐剂的例子包括乙基汞硫代水杨酸钠、o-甲酚、福尔
15 马林和苯甲醇。标准的药方可以是可注射的液体或可置于一合适的可注射液
体中如悬浮液或溶液中的固体。因此，在非液体药方中，赋形剂可包含葡萄
糖、人血清白蛋白、防腐剂等，它们是在给药前被加入无菌水或盐水中。

在本发明的一个实施方案中，治疗用组合物可以包括一种载体。该载
体包括在治疗动物中能增加治疗用组合物半衰期的化合物。合适的载体包括
20 但不限于多聚缓释载体、生物可降解植入物、脂质体、细菌、病毒、其他细
胞、油、酯和甘油。

本发明治疗用组合物的可接受的有效给药程序包括单一剂量大小、剂
量数、剂量给药频率及给药的方式。对此类程序的确定由本领域技术人员完
成。给药的方式包括但不限于皮下、真皮内、静脉内、鼻内、口服、经皮
25 (transdermal)、眼内、肌肉内。

本发明的另一实施方案是能够对患异常免疫或炎症的病人或对从他们身上分离的细胞检测改变了的FcR蛋白的诊断化合物。利用此处所描述的基于结构的药物设计方法，可用FcR蛋白的三维结构来得到能够同FcR蛋白结合的诊断试剂。本发明优选的诊断试剂包括那些能够同FcR蛋白的Ig结合位点结合的分子和能够同炎症病人循环FcR蛋白结合的分子。优选的诊断试剂包括对所检测化合物是致免疫的或能同所检测化合物进行化学偶联的分子，例如放射性同位素、酶、染料或生物素。

在一优选实施方案中，本发明的治疗用化合物或诊断化合物包括用重组DNA方法得到的工程蛋白。

10

表 1

REMARK	FcγRIIa 结构的最新坐标					
REMARK	按照 O 版本 (Version) 5.10.1 编写					
REMARK	1998 年 5 月 20 日 星期三 10:23:51					
CRYST1	79.221	100.866	28.172	90.00	90.00	90.00
ORIGX1	1.000000	0.000000	0.000000			0.000000
ORIGX2	0.000000	1.000000	0.000000			0.000000
ORIGX3	0.000000	0.000000	1.000000			0.000000
标度 1	0.012623	0.000000	0.000000			0.000000

00.11.09

标度 2	0.000000	0.009914	0.000000	0.000000
标度 3	0.000000	0.000000	0.035496	0.000000
5	原子 1 CB ALA 1	36.645	68.826	-4.702 1.00 51.37 6
	原子 2 C ALA 1	36.199	68.294	-2.285 1.00 42.22 6
	原子 3 O ALA 1	36.801	67.492	-1.569 1.00 42.70 8
	原子 4 N ALA 1	34.367	68.121	-3.997 1.00 45.74 7
	原子 5 CA ALA 1	35.829	67.992	-3.724 1.00 43.68 6
	原子 6 N PRO 2	35.903	69.499	-1.817 1.00 40.54 7
10	原子 7 CD PRO 2	35.149	70.546	-2.533 1.00 38.91 6
	原子 8 CA PRO 2	36.172	69.844	-0.425 1.00 38.61 6
	原子 9 CB PRO 2	35.765	71.300	-0.322 1.00 39.86 6
	原子 10 CG PRO 2	34.790	71.513	-1.426 1.00 41.36 6
	原子 11 C PRO 2	35.294	68.931	0.434 1.00 36.70 6
	原子 12 O PRO 2	34.188	68.654	-0.042 1.00 32.46 8
15	原子 13 N PRO 3	35.789	68.496	1.579 1.00 33.82 7
	原子 14 CD PRO 3	37.120	68.857	2.110 1.00 35.16 6
	原子 15 CA PRO 3	35.069	67.637	2.491 1.00 38.25 6
	原子 16 CB PRO 3	35.872	67.639	3.799 1.00 37.39 6
	原子 17 CG PRO 3	37.180	68.267	3.486 1.00 37.41 6
20	原子 18 C PRO 3	33.653	68.136	2.790 1.00 37.48 6
	原子 19 O PRO 3	33.393	69.335	2.683 1.00 34.39 8
	原子 20 N LYS 4	32.763	67.212	3.173 1.00 37.04 7
	原子 21 CA LYS 4	31.399	67.678	3.424 1.00 34.97 6
	原子 22 CB LYS 4	30.318	66.664	3.122 1.00 43.98 6
25	原子 23 CG LYS 4	30.564	65.191	3.278 1.00 47.64 6
	原子 24 CD LYS 4	29.775	64.349	2.292 1.00 52.03 6
	原子 25 CE LYS 4	28.317	64.743	2.137 1.00 57.56 6
	原子 26 NZ LYS 4	27.724	64.253	0.855 1.00 56.40 7
	原子 27 C LYS 4	31.243	68.234	4.825 1.00 31.44 6
30	原子 28 O LYS 4	31.846	67.769	5.784 1.00 29.91 8
	原子 29 N ALA 5	30.416	69.280	4.908 1.00 28.75 7
	原子 30 CA ALA 5	30.039	69.813	6.218 1.00 27.21 6
	原子 31 CB ALA 5	29.155	71.032	6.110 1.00 21.94 6
35	原子 32 C ALA 5	29.278	68.683	6.923 1.00 26.42 6
	原子 33 O ALA 5	28.760	67.794	6.222 1.00 26.10 8
	原子 34 N VAL 6	29.231	68.674	8.241 1.00 24.91 7
	原子 35 CA VAL 6	28.515	67.632	8.985 1.00 26.95 6
	原子 36 CB VAL 6	29.490	66.738	9.770 1.00 29.36 6
40	原子 37 CG1 VAL 6	28.779	65.726	10.676 1.00 29.86 6
	原子 38 CG2 VAL 6	30.434	66.024	8.801 1.00 26.74 6
	原子 39 C VAL 6	27.503	68.253	9.942 1.00 28.93 6
	原子 40 O VAL 6	27.846	68.994	10.866 1.00 31.46 8
	原子 41 N LEU 7	26.233	67.929	9.758 1.00 30.08 7
45	原子 42 CA LEU 7	25.105	68.383	10.546 1.00 29.33 6
	原子 43 CB LEU 7	23.839	68.346	9.657 1.00 33.18 6
	原子 44 CG LEU 7	22.828	69.458	9.960 1.00 34.94 6
	原子 45 CD1 LEU 7	22.082	69.876	8.721 1.00 27.55 6
	原子 46 CD2 LEU 7	21.887	69.002	11.069 1.00 32.30 6
50	原子 47 C LEU 7	24.816	67.565	11.794 1.00 29.57 6
	原子 48 O LEU 7	24.653	66.351	11.800 1.00 30.04 8
	原子 49 N LYS 8	24.768	68.242	12.930 1.00 28.04 7
	原子 50 CA LYS 8	24.568	67.692	14.257 1.00 25.12 6
	原子 51 CB LYS 8	25.738	68.179	15.132 1.00 33.32 6
55	原子 52 CG LYS 8	25.777	67.611	16.532 1.00 39.37 6
	原子 53 CD LYS 8	25.967	68.598	17.652 1.00 43.84 6
	原子 54 CE LYS 8	27.129	69.561	17.487 1.00 47.78 6
	原子 55 NZ LYS 8	27.525	70.175	18.793 1.00 48.98 7
	原子 56 C LYS 8	23.233	68.192	14.797 1.00 24.53 6
60	原子 57 O LYS 8	22.934	69.384	14.739 1.00 25.35 8
	原子 58 N LEU 9	22.423	67.310	15.333 1.00 24.78 7
	原子 59 CA LEU 9	21.080	67.553	15.843 1.00 22.07 6
	原子 60 CB LEU 9	20.189	66.483	15.190 1.00 20.04 6
	原子 61 CG LEU 9	18.725	66.363	15.596 1.00 20.57 6
65	原子 62 CD1 LEU 9	17.980	67.624	15.214 1.00 19.57 6
	原子 63 CD2 LEU 9	18.084	65.137	14.903 1.00 23.44 6
	原子 64 C LEU 9	21.019	67.415	17.346 1.00 21.01 6
	原子 65 O LEU 9	21.424	66.393	17.859 1.00 22.38 6
	原子 66 N GLU 10	20.583	68.410	18.118 1.00 22.53 7
	原子 67 CA GLU 10	20.480	68.285	19.567 1.00 21.02 6
70	原子 68 CB GLU 10	21.523	69.182	20.270 1.00 27.36 6
	原子 69 CGA GLU 10	22.971	68.778	20.090 0.50 29.21 6

00.11.09

	原子	70	CGB	GLU	10	22.946	68.657	20.195	0.50	38.29	6
	原子	71	CDA	GLU	10	24.047	69.789	20.422	0.50	28.55	6
	原子	72	CDB	GLU	10	23.100	67.202	20.587	0.50	43.48	6
	原子	73	OE1	GLU	10	25.131	69.365	20.907	0.50	26.56	8
5	原子	74	OE1	GLU	10	22.443	66.771	21.565	0.50	47.24	8
	原子	75	OE2	GLU	10	23.888	71.008	20.186	0.50	22.10	8
	原子	76	OE2	GLU	10	23.871	66.486	19.908	0.50	46.42	8
	原子	77	C	GLU	10	19.096	68.728	20.008	1.00	19.76	6
	原子	78	O	GLU	10	18.701	69.842	19.613	1.00	18.00	8
10	原子	79	N	PRO	11	18.423	67.995	20.888	1.00	19.07	7
	原子	80	CD	PRO	11	17.058	68.340	21.390	1.00	18.71	6
	原子	81	CA	PRO	11	18.834	66.662	21.319	1.00	18.84	6
	原子	82	CB	PRO	11	17.807	66.272	22.365	1.00	17.38	6
	原子	83	CG	PRO	11	16.560	67.000	21.944	1.00	18.86	6
15	原子	84	C	PRO	11	18.787	65.758	20.090	1.00	20.01	6
	原子	85	O	PRO	11	18.310	66.212	19.051	1.00	16.22	8
	原子	86	N	PRO	12	19.232	64.517	20.155	1.00	19.94	7
	原子	87	CD	PRO	12	19.915	63.948	21.361	1.00	21.08	6
	原子	88	CA	PRO	12	19.409	63.700	18.976	1.00	20.68	6
20	原子	89	CB	PRO	12	20.455	62.656	19.397	1.00	19.82	6
	原子	90	CG	PRO	12	20.292	62.567	20.872	1.00	23.59	6
	原子	91	C	PRO	12	18.179	63.061	18.395	1.00	18.70	6
	原子	92	O	PRO	12	18.268	62.475	17.318	1.00	19.85	8
	原子	93	N	TRP	13	17.039	63.169	19.059	1.00	15.64	7
25	原子	94	CA	TRP	13	15.815	62.568	18.561	1.00	17.91	6
	原子	95	CB	TRP	13	14.688	62.840	19.562	1.00	14.32	6
	原子	96	CG	TRP	13	15.124	62.749	21.005	1.00	16.77	6
	原子	97	CD2	TRP	13	15.633	61.612	21.703	1.00	16.90	6
	原子	98	CE2	TRP	13	15.899	62.005	23.032	1.00	16.87	6
30	原子	99	CE3	TRP	13	15.867	60.279	21.350	1.00	18.03	6
	原子	100	CD1	TRP	13	15.106	63.769	21.915	1.00	18.97	6
	原子	101	NE1	TRP	13	15.589	63.343	23.137	1.00	11.15	7
	原子	102	CZ2	TRP	13	16.405	61.124	23.973	1.00	15.92	6
	原子	103	CZ3	TRP	13	16.358	59.409	22.301	1.00	10.59	6
35	原子	104	CH2	TRP	13	16.645	59.825	23.611	1.00	17.87	6
	原子	105	C	TRP	13	15.421	63.033	17.163	1.00	19.47	6
	原子	106	O	TRP	13	15.283	64.238	16.908	1.00	17.22	8
	原子	107	N	ILE	14	15.101	62.078	16.275	1.00	16.57	7
	原子	108	CA	ILE	14	14.666	62.441	14.936	1.00	18.93	6
40	原子	109	CB	ILE	14	15.185	61.523	13.816	1.00	16.07	6
	原子	110	CG2	ILE	14	16.720	61.521	13.840	1.00	16.61	6
	原子	111	CG1	ILE	14	14.582	60.119	13.972	1.00	21.35	6
	原子	112	CD1	ILE	14	15.045	59.150	12.896	1.00	26.28	6
	原子	113	C	ILE	14	13.144	62.549	14.825	1.00	20.48	6
45	原子	114	O	ILE	14	12.652	63.048	13.817	1.00	19.41	8
	原子	115	N	ASN	15	12.403	62.087	15.836	1.00	19.46	7
	原子	116	CA	ASN	15	10.935	62.270	15.778	1.00	18.11	6
	原子	117	CB	ASN	15	10.161	60.962	15.731	1.00	13.53	6
	原子	118	CG	ASN	15	10.591	59.946	16.762	1.00	19.11	6
50	原子	119	OD1	ASN	15	11.728	59.959	17.227	1.00	13.35	8
	原子	120	ND2	ASN	15	9.688	59.033	17.142	1.00	10.11	7
	原子	121	C	ASN	15	10.632	63.124	17.005	1.00	17.54	6
	原子	122	O	ASN	15	11.016	62.735	18.111	1.00	15.32	8
	原子	123	N	VAL	16	10.122	64.331	16.805	1.00	16.86	7
55	原子	124	CA	VAL	16	9.871	65.273	17.893	1.00	15.77	6
	原子	125	CB	VAL	16	10.761	66.534	17.748	1.00	16.54	6
	原子	126	CG1	VAL	16	12.251	66.141	17.733	1.00	13.42	6
	原子	127	CG2	VAL	16	10.490	67.345	16.491	1.00	18.04	6
	原子	128	C	VAL	16	8.420	65.708	17.921	1.00	19.01	6
60	原子	129	O	VAL	16	7.618	65.381	17.010	1.00	17.12	8
	原子	130	N	LEU	17	8.022	66.422	18.964	1.00	17.68	7
	原子	131	CA	LEU	17	6.664	66.962	19.068	1.00	15.11	6
	原子	132	CB	LEU	17	6.162	66.726	20.522	1.00	20.26	6
	原子	133	CG	LEU	17	5.373	65.251	20.823	1.00	23.07	6
65	原子	134	CD1	LEU	17	5.447	65.013	22.253	1.00	17.70	6
	原子	135	CD2	LEU	17	4.832	64.714	19.855	1.00	26.74	6
	原子	136	C	LEU	17	6.563	68.439	18.732	1.00	16.37	6
	原子	137	O	LEU	17	7.518	69.187	18.961	1.00	18.24	8
	原子	138	N	GLN	18	5.424	68.931	18.227	1.00	18.55	7
70	原子	139	CA	GLN	18	5.237	70.370	18.032	1.00	19.13	6
	原子	140	CB	GLN	18	3.790	70.721	17.696	1.00	31.65	6

00.11.09

	原子	141	CG	GLN	18	3.510	71.249	16.314	1.00	37.32	6
	原子	142	CD	GLN	18	2.120	70.902	15.800	1.00	36.92	6
	原子	143	OE1	GLN	18	1.953	70.032	14.943	1.00	30.97	8
5	原子	144	NE2	GLN	18	1.135	71.618	16.333	1.00	31.73	7
	原子	145	C	GLN	18	5.561	71.077	19.348	1.00	19.43	6
	原子	146	O	GLN	18	5.194	70.568	20.413	1.00	18.10	8
	原子	147	N	GLU	19	6.317	72.164	19.232	1.00	19.68	7
	原子	148	CA	GLU	19	6.727	73.045	20.293	1.00	18.88	6
	原子	149	CB	GLU	19	5.597	73.341	21.293	1.00	27.39	6
10	原子	150	CG	GLU	19	4.649	74.418	20.714	1.00	30.12	6
	原子	151	CD	GLU	19	3.558	74.699	21.720	1.00	41.87	6
	原子	152	OE1	GLU	19	3.857	75.330	22.758	1.00	48.83	8
	原子	153	OE2	GLU	19	2.421	74.272	21.464	1.00	46.61	8
	原子	154	C	GLU	19	8.004	72.622	20.998	1.00	21.46	6
15	原子	155	O	GLU	19	8.496	73.405	21.815	1.00	26.39	8
	原子	156	N	ASP	20	8.606	71.506	20.619	1.00	19.91	7
	原子	157	CA	ASP	20	9.898	71.094	21.114	1.00	20.76	6
	原子	158	CB	ASP	20	10.285	69.649	20.726	1.00	13.47	6
	原子	159	CG	ASP	20	9.587	68.578	21.526	1.00	13.93	6
20	原子	160	OD1	ASP	20	8.873	68.805	22.534	1.00	17.57	8
	原子	161	OD2	ASP	20	9.723	67.405	21.104	1.00	13.79	8
	原子	162	C	ASP	20	11.002	71.950	20.451	1.00	19.58	6
	原子	163	O	ASP	20	10.913	72.219	19.262	1.00	17.49	8
	原子	164	N	SER	21	12.071	72.198	21.174	1.00	17.22	7
25	原子	165	CA	SER	21	13.233	72.929	20.659	1.00	17.62	6
	原子	166	CBA	SER	21	14.011	73.525	21.844	0.50	17.49	6
	原子	167	CBB	SER	21	13.981	73.556	21.846	0.50	13.14	6
	原子	168	OGA	SER	21	14.900	74.516	21.355	0.50	22.95	8
	原子	169	OGB	SER	21	13.175	74.579	22.416	0.50	6.85	8
30	原子	170	C	SER	21	14.181	72.038	19.873	1.00	18.61	6
	原子	171	O	SER	21	14.424	70.884	20.265	1.00	21.41	8
	原子	172	N	VAL	22	14.638	72.512	18.721	1.00	15.80	7
	原子	173	CA	VAL	22	15.585	71.733	17.910	1.00	17.93	6
	原子	174	CB	VAL	22	15.052	71.234	16.560	1.00	20.37	6
35	原子	175	CG1	VAL	22	16.093	70.401	15.804	1.00	17.77	6
	原子	176	CG2	VAL	22	13.858	70.300	16.679	1.00	17.26	6
	原子	177	C	VAL	22	16.822	72.609	17.665	1.00	19.20	6
	原子	178	O	VAL	22	16.633	73.769	17.291	1.00	18.52	8
	原子	179	N	THR	23	18.021	72.107	17.917	1.00	16.32	7
40	原子	180	CA	THR	23	19.249	72.823	17.648	1.00	19.99	6
	原子	181	CB	THR	23	20.080	73.128	18.911	1.00	22.97	6
	原子	182	OG1	THR	23	19.192	73.749	19.850	1.00	18.42	8
	原子	183	CG2	THR	23	21.241	74.057	18.614	1.00	16.78	6
	原子	184	C	THR	23	20.098	72.016	16.658	1.00	24.68	6
45	原子	185	O	THR	23	20.509	70.880	16.897	1.00	22.59	8
	原子	186	N	LEU	24	20.257	72.618	15.467	1.00	23.73	7
	原子	187	CA	LEU	24	21.081	72.051	14.423	1.00	23.11	6
	原子	188	CB	LEU	24	20.427	72.206	13.046	1.00	20.25	6
	原子	189	CG	LEU	24	19.053	71.480	12.959	1.00	23.95	6
50	原子	190	CD1	LEU	24	18.324	71.856	11.681	1.00	20.78	6
	原子	191	CD2	LEU	24	19.251	69.985	13.049	1.00	22.74	6
	原子	192	C	LEU	24	22.444	72.763	14.450	1.00	25.87	6
	原子	193	O	LEU	24	22.470	74.008	14.537	1.00	24.57	8
	原子	194	N	THR	25	23.520	71.980	14.367	1.00	20.22	7
55	原子	195	CA	THR	25	24.847	72.600	14.336	1.00	23.21	6
	原子	196	CB	THR	25	25.656	72.265	15.597	1.00	27.69	6
	原子	197	OG1	THR	25	24.945	72.730	16.755	1.00	26.30	8
	原子	198	CG2	THR	25	27.041	72.925	15.590	1.00	28.49	6
	原子	199	C	THR	25	25.604	72.166	13.075	1.00	22.31	6
60	原子	200	O	THR	25	25.706	70.951	12.819	1.00	23.86	8
	原子	201	N	CYS	26	26.092	73.134	12.307	1.00	18.68	7
	原子	202	CA	CYS	26	26.832	72.888	11.075	1.00	23.20	6
	原子	203	C	CYS	26	28.345	72.910	11.346	1.00	23.06	6
	原子	204	O	CYS	26	28.957	73.980	11.556	1.00	23.76	8
65	原子	205	CB	CYS	26	26.509	73.881	9.958	1.00	17.92	6
	原子	206	SG	CYS	26	27.138	73.358	8.311	1.00	22.25	16
	原子	207	N	GLN	27	28.929	71.729	11.355	1.00	19.35	7
	原子	208	CA	GLN	27	30.332	71.521	11.658	1.00	23.30	6
	原子	209	CB	GLN	27	30.543	70.209	12.464	1.00	29.78	6
70	原子	210	CG	GLN	27	29.623	70.044	13.672	1.00	31.50	6
	原子	211	CD	GLN	27	29.927	68.828	14.518	1.00	33.01	6

